
MASTERARBEIT

Herr B.Sc.
Alexander Hampel

**Klassifizierung und Charak -
terisierung von Schimmel -
pilzen unter Verwendung
von sequenziellen
Bestimmungsschlüsseln**

Mittweida, 2014

MASTERARBEIT

Klassifizierung und Charakterisierung von Schimmelpilzen unter Verwendung von sequenziellen Bestimmungsschlüsseln

Autor:
Herr B.Sc.

Alexander Hampel

Studiengang:
Molekularbiologie / Bioinformatik

Seminargruppe:
MO12 - W1 M

Erstprüfer:
Prof. Dr. rer. nat. habil. Dirk Labudde

Zweitprüfer:
M. Sc. Marleen Kreuzer

Einreichung:
Mittweida, 25.08.2014

Verteidigung/Bewertung:
Mittweida, 2014

MASTER THESIS

Classification and character - ization of molds by means of sequentially identification keys

author:
Mr. B.Sc.

Alexander Hampel

course of studies:
molecular biology / bioinformatics

seminar group:
MO12 - W1 M

first examiner:
Prof. Dr. rer. nat. habil. Dirk Labudde

second examiner:
M. Sc. Marleen Kreuzer

submission:
Mittweida, 25.08.2014

defence/ evaluation:
Mittweida, 2014

Bibliografische Beschreibung:

Hampel, Alexander:

Klassifizierung und Charakterisierung von Schimmelpilzen unter Verwendung von sequenziellen Bestimmungsschlüsseln. - 2014. - 23, 102, 0 S.

Mittweida, Hochschule Mittweida, Fakultät Mathematik / Naturwissenschaften / Informatik, Masterarbeit, 2014

Referat:

Ziel dieser Masterarbeit ist es, unter Verwendung sequenzieller Bestimmungsschlüssel eine phylogenetische Analyse für Schimmelpilze durchzuführen. Hierfür wurden sechs verschiedene Ansätze realisiert, wodurch eine Differenzierung und Charakterisierung der Schimmelpilze ermöglicht werden soll.

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei all denjenigen bedanken, die diese Masterarbeit durch ihre fachliche und persönliche Unterstützung begleitet haben.

Einen besonderen Dank gilt Herrn Prof. Dirk Labudde, welcher mich mit konstruktiver Kritik inspirierte und meinen Ideen offen gegenüber stand.

Ebenfalls möchte ich bei Frau M. Sc. Marleen Kreuzer. Sie unterstützte mich als Betreuerin durch hilfreiche Anregungen und motivierende Gespräche.

Den Herren B. Sc. Silvio Oswald und B. Sc. Mathias Langer sei ebenfalls mein Dank ausgesprochen, welche mich durch Gespräche in meiner Betrachtungsweise für diese Arbeit bestätigt haben.

Auch meiner Mutter Frau Jana Hampel möchte ich herzlich für ihre Unterstützung danken.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----|
| Inhaltsverzeichnis..... | I |
| Abbildungsverzeichnis..... | V |
| Tabellenverzeichnis..... | VII |
| Abkürzungsverzeichnis | IX |
| Kapitel 1 Einleitung..... | 1 |
| Kapitel 1.1 Motivation | 2 |
| Kapitel 1.2 Zielstellung | 3 |
| Kapitel 1.3 Ein Überblick für die folgenden Kapitel | 4 |
| Kapitel 2 Vorstellung der ausgewählten Schimmelpilze und sequenziellen Marker..... | 5 |
| Kapitel 2.1 Ausgewählte Schimmelpilze | 5 |
| Kapitel 2.2 Ausgewählte sequenzielle Marker | 15 |
| Kapitel 3 Generierung und Aufbereitung des DNA - Sequenzdatensatzes | 19 |
| Kapitel 3.1 Generierung des Datensatzes | 19 |
| Kapitel 3.2 Aufbereitung des Datensatzes | 20 |
| Kapitel 3.3 Vergleich zwischen Literatur und dem Datensatz | 23 |
| Kapitel 4 Vorstellung der verwendeten bioinformatischen Algorithmen und Tools | 25 |
| Kapitel 4.1 Der <i>ClustalW</i> - Algorithmus | 25 |
| Kapitel 4.2 Der <i>Muscle</i> - Algorithmus | 27 |
| Kapitel 4.3 Der <i>UPGMA</i> - Algorithmus..... | 29 |
| Kapitel 4.4 Der <i>Neighbor - Joining</i> - Algorithmus | 29 |
| Kapitel 4.5 Das <i>Bootstrap</i> - Verfahren | 30 |
| Kapitel 4.6 Das Programm <i>MEGA 6</i> und dessen Maskenoptionen | 31 |
| Kapitel 4.7 <i>Consensus Maker</i> | 39 |
| Kapitel 4.8 Der Konsensusbaum | 40 |
| Kapitel 5 Ansätze zur phylogenetischen Bestimmung von Schimmelpilzen | 42 |
| Kapitel 5.1 Phylogenetische Bestimmung durch Konsensussequenzen | 42 |
| Ansatz 1: Phylogenetische Bestimmung unter Verwendung von vier Markern..... | 42 |

| | |
|---|----|
| Ansatz 2: Phylogenetische Bestimmung unter Verwendung von fünf Markern | 47 |
| Kapitel 5.2 Phylogenetische Bestimmung der Schimmelpilze für ihrer Gattungen .. | 47 |
| Ansatz 3: Globale phylogenetische Bestimmung der Schimmelpilze (<i>ClustalW</i>) .. | 47 |
| Ansatz 4: Globale phylogenetische Bestimmung der Schimmelpilze (<i>Muscle</i>) | 50 |
| Kapitel 5.3 Phylogenetische Bestimmung der Schimmelpilze für ihrer Arten | 53 |
| Ansatz 5: Artspezifische phylogenetische Bestimmung (<i>ClustalW</i>) | 53 |
| Ansatz 6: Artspezifische phylogenetische Bestimmung (<i>Muscle</i>) | 55 |
| Kapitel 5.4 Zusammenfassung der Ansätze | 57 |
| Kapitel 6 Ergebnisse der Ansätze aus den phylogenetischen Analysen und ihre Bedeutungen..... | 60 |
| Kapitel 6.1 Ansatz 1 | 60 |
| <i>UPGMA</i> | 60 |
| <i>Neighbor - Joining</i> | 62 |
| Zusammenfassung Ansatz 1 | 64 |
| Kapitel 6.2 Ansatz 2 | 64 |
| <i>UPGMA</i> | 64 |
| <i>Neighbor - Joining</i> | 65 |
| Zusammenfassung Ansatz 2..... | 66 |
| Kapitel 6.3 Ansatz 3 | 67 |
| <i>UPGMA, ClustalW_01</i> | 67 |
| <i>Neighbor - Joining, ClustalW_01</i> | 68 |
| Zusammenfassung Ansatz 3 <i>ClustalW_01</i> | 68 |
| <i>UPGMA, ClustalW_02</i> | 69 |
| <i>Neighbor - Joining, ClustalW_02</i> | 69 |
| Zusammenfassung Ansatz 3 <i>ClustalW_02</i> | 70 |
| Kapitel 6.4 Ansatz 4 | 70 |
| <i>UPGMA, Muscle_01</i> | 70 |
| <i>Neighbor - Joining, Muscle_01</i> | 71 |
| Zusammenfassung Ansatz 4 <i>Muscle_01</i> | 71 |
| <i>UPGMA, Muscle_02</i> | 71 |
| <i>Neighbor - Joining, Muscle_02</i> | 72 |

| | |
|---|-------|
| Zusammenfassung Ansatz 4 <i>Muscle_02</i> | 72 |
| Kapitel 6.5 Ansatz 5 | 73 |
| <i>UPGMA, ClustalW_01</i> | 73 |
| <i>Neighbor - Joining, ClustalW_01</i> | 76 |
| <i>UPGMA, ClustalW_02</i> | 78 |
| <i>Neighbor - Joining, ClustalW_02</i> | 79 |
| Zusammenfassung Ansatz 5 | 81 |
| Kapitel 6.6 Ansatz 6 | 82 |
| <i>UPGMA, Muscle_01</i> | 82 |
| <i>Neighbor - Joining, Muscle_01</i> | 85 |
| <i>UPGMA, Muscle_02</i> | 86 |
| <i>Neighbor - Joining, Muscle_02</i> | 88 |
| Zusammenfassung Ansatz 6 | 89 |
| Kapitel 6.7 Zusammenfassung der phylogenetischen Bäume unter Berücksichtigung der sechs Ansätze | 91 |
| Kapitel 7 Ableitung der Bestimmungsschlüssel | 97 |
| Kapitel 7.1 Gattungsspezifische Bestimmungsschlüssel | 97 |
| Kapitel 7.2 Artspezifische Bestimmungsschlüssel | 98 |
| Kapitel 8 Zusammenfassung und Ausblick | 101 |
| Literaturverzeichnis | IX |
| Selbstständigkeitserklärung..... | XXIII |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1 - 2.1 <i>Alternaria alternata</i> Spore | 6 |
| Abbildung 2 - 2.1 <i>Aspergillus niger</i> Konidienträger ²⁴ | 8 |
| Abbildung 3 - 2.1 <i>Fusarium oxysporum</i> Sporen | 11 |
| Abbildung 4 - 2.1 <i>Mucor mucedo</i> Sporen ⁴⁶ | 12 |
| Abbildung 5 - 2.2 <i>Internal transcribed spacer</i> | 16 |
| Abbildung 6 - 4.1 schematische Darstellung von <i>ClustalW</i> | 26 |
| Abbildung 7 - 4.2 schematische Darstellung des <i>Muscle</i> - Algorithmus | 28 |
| Abbildung 8 - 4.6 Maske <i>MEGA 6</i> für <i>ClustalW</i> | 32 |
| Abbildung 9 - 4.6 Maske <i>MEGA 6</i> für <i>Muscle</i> | 33 |
| Abbildung 10 - 4.6 Maske <i>MEGA 6</i> für <i>ClustalW</i> Codon | 34 |
| Abbildung 11 - 4.6 Maske <i>MEGA 6</i> für <i>Neighbor - Joining</i> und nicht kodierender DNA . | 36 |
| Abbildung 12 - 4.6 Maske <i>MEGA 6</i> für <i>Neighbor - Joining</i> für kodierende DNA | 38 |
| Abbildung 13 - 4.7 Maske <i>Consensus Maker</i> ¹⁴³ | 39 |
| Abbildung 14 - 4.8 Konstruktion des Konsensusbaums ¹⁴⁸ | 41 |
| Abbildung 15 - 5.4 Zusammenfassung der Ansätze | 57 |
| Abbildung 16 - 6.1 <i>UPGMA - RPB2</i> | 61 |
| Abbildung 17 - 6.1 <i>NJ - RPB2</i> | 62 |
| Abbildung 18 - 6.1 <i>NJ</i> - Konsensusbaum | 63 |
| Abbildung 19 - 6.5 <i>UPGMA, TEF1, Trichoderma</i> | 76 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|-----|
| Tabelle 1 - 2.1 Zusammenfassung der zu untersuchenden Schimmelpilze | 14 |
| Tabelle 2 - 3.2 Übersicht des Datensatzes | 20 |
| Tabelle 3 - 3.2 globale Redundanz für alle Schimmelpilze..... | 22 |
| Tabelle 4 - 5.1 Auswahl der Schimmelpilze | 42 |
| Tabelle 5 - 5.1 Parameter <i>ClustalW (EBI)</i> | 43 |
| Tabelle 6 - 5.1 Ausschluss von Schimmelpilzen (Ansatz 1) | 44 |
| Tabelle 7 - 5.1 Parameter für <i>Consensus Maker</i> | 44 |
| Tabelle 8 - 5.1 Parameter <i>ClustalW_01 Mega 6</i> | 45 |
| Tabelle 9 - 5.1 Parametereinstellung für <i>Neighbor - Joining</i> und <i>UPGMA</i> unter <i>Mega 6</i> | 46 |
| Tabelle 10 - 5.1 Parameter für <i>consense</i> | 46 |
| Tabelle 11 - 5.2 Betrachte Schimmelpilze in Abhängigkeit der Marker (global)..... | 48 |
| Tabelle 12 - 5.2 Parameter für <i>ClustalW_02</i> unter Verwendung von <i>Mega 6</i> | 49 |
| Tabelle 13 - 5.2 Entfallene Schimmelpilze nach der Optimierung des Datensatzes..... | 49 |
| Tabelle 14 - 5.2 Datensatzseparierung für <i>TUB2</i> | 50 |
| Tabelle 15 - 5.2 Parameter für <i>Muscle</i> unter Verwendung von <i>Mega 6</i> | 51 |
| Tabelle 16 - 5.2 Entfallene Schimmelpilze nach der Optimierung des Datensatzes..... | 52 |
| Tabelle 17 - 5.2 Datensatzseparierung für <i>TUB2</i> | 53 |
| Tabelle 18 - 5.3 Datensatz für die artspezifische phylogenetische Bestimmung | 54 |
| Tabelle 19 - 5.3 Entfallene Arten nach der Optimierung des Datensatzes | 55 |
| Tabelle 20 - 5.3 Entfallene Arten nach der Optimierung des Datensatzes | 56 |
| Tabelle 21 - 6.7 Zusammenfassung des Ansatz 1 und Ansatz 2 | 91 |
| Tabelle 22 - 6.7 Zusammenfassung des Ansatz 3 und Ansatz 4 | 92 |
| Tabelle 23 - 6.7 Zusammenfassung des Ansatz 3 und Ansatz 4 | 93 |
| Tabelle 24 - 6.7 Zusammenfassung des Ansatz 5 und Ansatz 6 | 93 |
| Tabelle 25 - 6.7 Zusammenfassung des Ansatz 5 und Ansatz 6 | 96 |
| Tabelle 26 - 8 Mögliche Bestimmungsschlüssel für die Differenzierung der Arten und Gattungen | 101 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------------------------|-------------------------------------|
| <i>A. versicolor</i> | <i>Aspergillus versicolor</i> |
| <i>A. penicillioides</i> | <i>Aspergillus penicillioides</i> |
| <i>A. niger</i> | <i>Aspergillus niger</i> |
| <i>A. vitis</i> | <i>Aspergillus vitis</i> |
| <i>A. glaucus</i> | <i>Aspergillus glaucus</i> |
| <i>A. alternata</i> | <i>Alternaria alternata</i> |
| <i>A. tenuissima</i> | <i>Alternaria tenuissima</i> |
| <i>A. pullulans</i> | <i>Aureobasidium pullulans</i> |
| ACT | Aktin |
| ALP | Alkaline Protease |
| BOLD | Barcode of Life Database |
| bp | Basenpaare |
| Bt - Wert | Bootstrap - Wert |
| <i>C. herbarum</i> | <i>Cladosporium herbarum</i> |
| <i>C. cladosporioides</i> | <i>Cladosporium cladosporioides</i> |
| CHIT1 | Chitinase I |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| <i>E. nigrum</i> | <i>Epicoccum nigrum</i> |

*F. oxysporum**Fusarium oxysporum**F. solani**Fusarium solani*

GUI

graphical user interface

ITS1

Internal transcribed spacer I

ITS2

Internal transcribed spacer II

*M. mucedo**Mucor mucedo*

MEGA 6

Molecular Evolutionary Genetics Analysis
Version 6.0

MSA

multiple sequence alignment

Muscle

multiple sequence comparison by logexpectation

NCBI

National Center for Biotechnology Information

NJ

Neighbor - Joining

*P. chrysogenum**Penicillium chrysogenum**P. funiculosum**Penicillium funiculosum**P. glaucum**Penicillium glaucum**RPB2*

RNA - Polymerase II

rRNA

ribosomale Ribonukleinsäure

*T. harzianum**Trichoderma harzianum**T. viride**Trichoderma viride*

| | |
|-------------|--|
| <i>TEF1</i> | Elongation - Faktor I |
| <i>TOP2</i> | Topoisomerase II |
| tRNA | Transfer-RNA |
| <i>TUB2</i> | Beta - Tubulin |
| UPGMA | Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean |

Kapitel 1 Einleitung

"Sehr geringe Unterschiede begründen manchmal sehr große Verschiedenheiten."

Marie Freifrau von Ebner-Eschenbach, Aphorismen

Dieses Zitat könnte für die Untersuchung von Lebewesen kaum treffender sein. In allen Bereichen der Biologie, sei es in der Morphologie, der Mikrobiologie oder der Molekularbiologie findet man eine Vielzahl an Beispielen, wo ähnliche Sachverhalte zu komplexen Unterschieden führen. Die Methylierung in der Epigenetik führt dazu, dass gleiche Arten einer Gattung ein unterschiedliches Methylierungsmuster besitzen, was zu einer großen Verschiedenheit des Phänotyps führen kann.¹ In der Mikrobiologie entscheidet die geringste Änderung der Konzentration von Chemikalien über das Wachstum von Bakterienkolonien. Die Molekularbiologie lehrt, dass der Austausch eines einzelnen Nukleotids für Mutationen und der fortlaufenden Evolution verantwortlich sein kann.²

Die hier vorliegende Masterarbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung eines sequenziellen Bestimmungsschlüssels für die Klassifizierung von Schimmelpilzen. Die Notwendigkeit für einen Bestimmungsschlüssel entsteht aus der Problematik, dass kein etabliertes Bestimmungssystem für die klassische Mikroskopie existiert. Dies kommt durch morphologische Divergenz artverwandter Schimmelpilze bezüglich des Materiales zu Stande, auf welchem der Schimmelpilz wächst.³ Es scheint wirklich, dass in der Biologie kleinste Unterschiede zu große Veränderungen führen.

Für die Entwicklung des Bestimmungsschlüssels werden DNA - Sequenzdaten verwendet, welche durch multiple Sequenzalignments und phylogenetische Analysen eine Aussage über die Qualität und Verwertbarkeit des Bestimmungsschlüssels geben sollen. Für die Analysen werden spezifische sequenzielle Marker bezüglich einer Auswahl an Schimmelpilzen verwendet.

Die Arbeit ist Teil einer Forschungskooperation der *Hochschule Mittweida University of Applied Sciences*, dem *Forschungsinstitut für Leder und Kunststoffbahnen (FILK)*, sowie dem *Institut für Holztechnologie Dresden (IHD)*.

¹ [Kegel2009]

³ [Leppchen 2014]

² [Dawkins 2007]

Kapitel 1.1 Motivation

Schimmelpilze sind für Unternehmen, welche mit Naturrohstoffen, wie Holz und Leder, handeln bzw. arbeiten ein wirtschaftliches Risiko. Unter ungünstigen Lagerumgebungen können diese Materialien bei dem Transport und der Weiterverarbeitung unter Schimmelbefall leiden. Daher müssen spezifische Behandlungsverfahren zur Vorbeugung und Nachbehandlung von Schimmelpilzbefall etabliert werden.⁴

Schimmelwachstum entsteht auf verschiedenen Materialien durch erhöhter Feuchte und Temperaturschwankungen. Der Befall setzt immer eine hohe Feuchte des Materials oder der Umgebung voraus. Problematisch ist, dass die Schimmelpilzausbreitung nicht auf einen Feuchtigkeitswert normiert werden können. Während die Feuchteansprüche bei *Aspergillus* und *Eurotium* gering sind, benötigen *Chaetomium*, *Epicoccum*, *Doratomyces*, *Acremonium* und *Trichoderma* einen höheren Feuchtigkeitsgrad.⁵ Das Wachstum wird des Weiteren durch Temperaturen im Bereich von 0 °C bis ca. 40 °C toleriert.⁴ Die Sporenverbreitung der Pilze ermöglicht auch ein Überleben in ungünstigen Bedingungen, was zur erneuten Verbreitung führt, wenn klimatische Zustände der Lieferkette sich ändern oder die Lagerbedingungen im Konflikt zu klimatische Umgebungsbedingungen der Verbraucher stehen.⁶ Beispielsweise wird Schuhleder anderen äußeren Bedingungen ausgesetzt, wenn dieses zur Verarbeitung gelagert oder vom Verbraucher getragen wird.

Neben den entstehenden optischen Schäden können Schimmelpilze auch Krankheiten auslösen, wodurch Mitarbeiter in unmittelbarer Nähe des Leders sowie der Verbraucher betroffen sein können. Von Schimmelpilzen geht generell eine gesundheitliche Gefährdung aus.⁵ Zu den häufigsten Auslösern gehören *Aspergillus* und *Alternaria*.⁷ Typische Erkrankungen sind unter anderem:

- Bronchitis
- Erkrankungen der Atemwege
- Hauterkrankungen
- erhöhte Infektionsanfälligkeit
- Magen - Darmerkrankungen
- Allergische Erkrankungen^{7,8}

Aktuell erfolgen Differenzierungen der Schimmelpilze durch wissenschaftliche Experten, wenn die zu untersuchenden Proben bereits typische Charakteristiken durch den Schimmelpilzbefall aufweisen. In diesem Fall wäre eine Untersuchung sowie die

⁴ [Leppchen 2014]

⁶ [UBA 2005]

⁸ [URL 1]

⁵ [LGA 2004]

⁷ [Schultze 2011]

Behandlung des Schimmels ein schnelles und kostengünstiges Unterfangen.⁹ Da in den meisten Fällen die Proben keine normierten Nährmedien und übertragbare Merkmale der Schimmelpilze besitzen und dem akuten Befall vorzubeugen ist, steigen Zeit und Kosten drastisch. Das Wachstum sowie die morphologische Ausprägung der Schimmelpilze werden im Wesentlichen durch das Substrat beeinflusst. Die Merkmalsausbildung weicht in der Praxis oft von den in der Literatur beschriebenen Merkmalen ab.⁹ Merkmale sind z.B. Verzweigungen der Sporenträger oder die Struktur der Konidienträger.

Als Alternativansatz soll die vorliegende Masterarbeit ein bioinformatisches Verfahren entwickeln, welches den morphologischen Ansatz erweitern soll. Für diesen Zweck werden sequenzielle Bestimmungsschlüssel etabliert. Eine Weiterentwicklung der morphologischen Betrachtung erfolgt in einer parallel verlaufenden *Masterarbeit von Frau Fröbel*.

Kapitel 1.2 Zielstellung

Noch existieren keine speziellen Schlüssel für die Identifikation von Schimmelpilzarten auf Naturstoffen wie Holz oder Leder. Ziel der Kooperationsforschungsarbeit ist die Etablierung des Assistenzprogrammes eines Datenbankensystems für die Klassifizierung von Schimmelpilzen unter Berücksichtigung von Bestimmungsschlüsseln auf sequenzieller und morphologischer Ebene. Die daraus resultierenden spezifischen Behandlungsmethoden für befallenen Oberflächen werden aus diesen Ergebnissen abgeleitet. Diese Datenbank soll eine breit anwendbare Methode zur schnellen, sicheren und kostengünstigen Schimmelpilzdiagnostik etablieren und für die Behandlung weiterer Oberflächen ausgeweitet werden.⁹ Das Ziel der hier vorliegenden Masterarbeit ist die Charakterisierung und Differenzierung von Schimmelpilzen bezüglich ihrer Gattungen und Arten auf der Grundlage von sequenziellen Markern. Es wird untersucht, welche Marker sich als Bestimmungsschlüssel eignen.

Zu Beginn des Projektes wurden durch die vertretenden Forschungsgruppen bestimmte Schimmelpilze und sequenzielle Marker ausgewählt, welche die spätere Datengrundlage der vorliegenden Masterarbeit repräsentieren. Die Auswahl erfolgte dabei durch die jahrelange Erfahrung einzelner Forschungsgruppen und wissenschaftlicher Untersuchungen.⁹

⁹ [Leppchen 2014]

Kapitel 1.3 Ein Überblick für die folgenden Kapitel

Eine charakteristische Beschreibung der Schimmelpilze sowie der Marker wird im Kapitel 2 *Vorstellung der ausgewählten Schimmelpilze und sequenziellen Marker* beschrieben. Die Recherche für die Erstellung des DNA - Sequenzdatensatzes unter Verwendung von Biodatenbanken sowie die anschließende Datenaufbereitung erfolgt in Kapitel 3 *Generierung und Aufbereitung des DNA - Sequenzdatensatzes*. Das Kapitel 4 *Vorstellung der verwendeten bioinformatischen Algorithmen und Tools* erklärt Algorithmen, Programme und Parameter für die späteren phylogenetische Analysen. Nachdem die Grundlagen für die Masterarbeit betrachtet wurden, erfolgt eine Beschreibung verschiedener methodischer Ansätze der phylogenetischen Analysen in Kapitel 5 *Ansätze der phylogenetischen Bestimmung der Schimmelpilze*. Die Ergebnisse der phylogenetischen Bäume und die daraus differenzierten Arten und Gattungen werden im Kapitel 6 *Ergebnisse der Ansätze aus den phylogenetischen Analysen und ihre Bedeutungen* diskutiert. Die aus den Ergebnissen von Kapitel 6 resultierenden Bestimmungsschlüssel werden in Kapitel 7 *Ableitung der Bestimmungsschlüssel* vorgestellt. Eine Zusammenfassung der Resultate dieser Masterarbeit sowie eine zusätzliche Diskussionen über den weiteren Wertegang des Forschungsprojektes aus den erarbeiteten Ergebnissen erfolgt abschließend in Kapitel 8 *Zusammenfassung und Ausblick*.

Kapitel 2 Vorstellung der ausgewählten Schimmelpilze und sequenziellen Marker

Dieses Kapitel soll einen Überblick über die verwendeten Schimmelpilze sowie der sequenziellen Marker liefern, welche für die Entwicklung der Bestimmungsschlüssel zu Grunde liegen.

Kapitel 2.1 Ausgewählte Schimmelpilze

Im Folgenden werden die Schimmelpilze, welche durch die Forschungsgruppen ausgewählt wurden, vorgestellt.

Alternaria alternata

Dieser Schimmelpilz gehört zu den weltweit verbreitetsten Schimmelpilzen und ist ein Vertreter der *Dematiaceae* (Schwärzepilze). Häufig zu finden ist dieser in Sumpfgebieten sowie in Wäldern speziell auf Laub und Geäst. Problematisch ist sein Vorkommen in Lebensmitteln wie Mehl und Gemüse aber auch auf Textilien. Die Produktion der Mykotoxine (speziell *Tenuazonssäure*) kann zu gesundheitlichen Risiken führen wie Allergien, Asthma und Nesselfieber. Typisch für *Alternaria* - Arten sind vor allem Infektionserkrankungen auf der Haut.^{10,11} Die Sporen von *Alternaria alternata* sind durch die Einlagerung von *Melanin* dunkel gefärbt und lassen sich auf Hauswänden leicht erkennen.¹¹ In Abbildung 1 - 2.1 ist eine Spore von *Alternaria alternata* dargestellt.

Das Wachstum des Schimmelpilzes beträgt nach 24 Stunden ca. 1 cm. Des Weiteren lassen sich in dieser Zeitspanne erste Sporulationen feststellen, welche jedoch durch Lichtintensität im Wachstum beeinflusst und somit unter lichtärmeren Bedingungen begünstigt werden. Die Temperatur das Wachstum beträgt 2,5° C bis 32,0° C. Besitzt das Milieu einen pH - Wert zwischen 2,7 und 8,0, erfolgt das Wachstum von *Alternaria* - Arten.¹⁰

¹⁰ [Kück 2009]

¹¹ [URL 2]

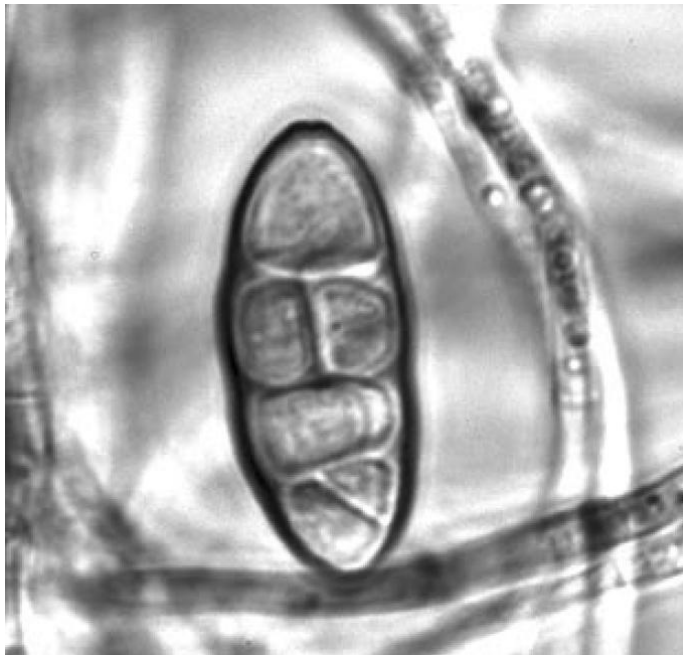


Abbildung 1 - 2.1 *Alternaria alternata* Spore¹²

Dargestellt ist eine einzelne Spore von *Alternaria alternata*. Charakteristisch ist ihr mehrzelliger Aufbau sowie ihre dicken Zellwände.¹³

Alternaria tenuissima

Alternaria tenuissima findet sich in denselben Lebensräumen wie *Alternaria alternata* und ist ein Vertreter der *Dematiaceae*. Des Weiteren ist *A. tenuissima* für den Befall von Zimmerpflanzen verantwortlich. Eine Besonderheit zu seinem Artverwandten ist, dass sein Wachstum unter eingeschränkteren Bedingungen erfolgt. Das Milieu sollte in einem Temperaturintervall zwischen 6° C und 28° C liegen. Der optimale pH - Wert liegt bei 5,0. Die gesundheitliche Gefährdung von *Alternaria tenuissima* ist mit *Alternaria alternata* gleichzusetzen.^{14,15}

Aspergillus glaucus

Aspergillus glaucus oder auch *Eurotium herbariorum* genannt ist einer der häufigsten Vertreter des Schimmelbefalls in Häusern und regelmäßig auf Textilien auffindbar.¹⁶ *Aspergillus* gehört zu den Gattungen mit den meisten Arten. Die Anzahl beläuft sich bei etwa 260 Arten.¹⁷ Eine Besonderheit von *Aspergillus glaucus* verglichen mit anderen

¹² [Kück 2009] ¹⁴ [URL 3] ¹⁶ [URL 5]

¹³ [URL 2] ¹⁵ [URL 4] ¹⁷ [URL 7]

Aspergillus - Arten ist, dass er zu den wenigen Schimmelpilzen gehört, die sich asexuell sowie sexuell fortpflanzen (Teleomorphe) können.¹⁸ Sein Mykotoxin *Ochratoxin A* ist Auslöser für Allergien und Nierenerkrankungen.¹⁹

Aspergillus niger

Diese Art ist eine der am häufigsten anzutreffenden *Aspergillus* - Arten und wird als omnipräsent angesehen. Zu der geläufigsten Erkrankung zählt die Infektionen *pulmonale Aspergillose*²⁰. Dennoch gehört dieser Schimmelpilz zu den gering gesundheitsgefährdenden Schimmelpilzen der *Aspergillus* - Arten. Unabhängig von seinen gesundheitlichen Gefahren wird *Aspergillus niger* häufig in biotechnologischen Verfahren eingesetzt, um unterschiedlichste organische Säuren herzustellen, beispielsweise Zitronensäure.²¹

Schwierig ist eine Unterscheidung von *Aspergillus* - Arten, da viele Arten mit *Aspergillus niger* verwechselt werden. Grund ist ihre morphologische Ähnlichkeit (Vergleich mit Abbildung 2 - 2.1). Sie werden daher durch molekularbiologische Analysen unterschieden.²²

Das Wachstum von *Aspergillus niger* ist bei Temperaturen von 17° C bis 42 °C möglich. Die maximale Temperaturgrenze steht dabei um 10° C höher im Vergleich zu *Alternaria alternata*. Das Milieu kann einen pH - Wert zwischen 5,5 und 6,5 besitzen.^{22, 23}

¹⁸ [URL 6]

²¹ [URL 7]

²³ [URL 10]

¹⁹ [Römpf]

²² [Kück 2099]

²⁰ Lungen - oder Nervensystembefall von Personen mit geschwächten Immunsystem. Die Infektion erfolgt durch Einatmung der Sporen. [Nübling]



Abbildung 2 - 2.1 *Aspergillus niger* Konidienträger²⁴

Dargestellt ist ein Konidienträger (stäbchenförmig) des *Aspergillus niger*. Die Konidiosporen (rau und kugelförmig) sind für Infektionskrankheiten verantwortlich. Eine Unterscheidung von *Aspergillus niger* und *Aspergillus glaucus* ist durch diese Merkmale nicht möglich, da sich die Konidienträger morphologisch zu ähnlich sind.²⁴

Aspergillus penicillioides

Dieser Schimmelpilz ist ein häufiger Vertreter von schimmelbefallenen Innenräumen. Durch das Wachstum unter erhöhter Feuchte gilt *Aspergillus penicillioides* als Indikator für Feuchteschäden.²⁵ *Aspergillus penicillioides* ist wie *Aspergillus niger* omnipräsent und gering pathogen, kann jedoch zu Allergien und Hautentzündungen führen.²⁶

²⁴ [Kück 2009]

²⁶ [URL 8]

²⁵ [Gabrio]

Aspergillus versicolor

Neben dem Auslösen von Allergien besteht vor allem durch das Mykotoxin *Sterigmatocystin* die Gefahr für *canceroge*, *hepatotoxische* (Leber schädigend) sowie *nephrotoxisch* (Nieren schädigend) Erkrankungen.²⁷ Das häufigste Vorkommen von *Aspergillus versicolor* ist der Befall von Lebensmitteln, feuchten Innenräumen sowie Naturtextilien wie Leder.²⁷ Ein Wachstum erfolgt bei Temperaturen zwischen 4° C und 40° C sowie auf einem Milieu mit einem pH - Wert von 5,5.²⁸

Aspergillus vitis

Aspergillus vitis ist seltener vertreten als *Aspergillus niger* und *Aspergillus penicillioides* und kommt des Häufigen auf Leder, Gummi und Papier vor. *Aspergillus vitis* ist ebenfalls wie *Aspergillus glaucus* ein teleomorpher Schimmelpilz und unter der Bezeichnung *Eurotium amstelodami* bekannt.²⁸ Auch ist *Aspergillus vitis* im Vergleich der bisher vorgestellten Schimmelpilze als *xerophil* (bevorzugt trockene Standorte) anzusehen. Der Schimmelpilz ist Allergien auslösend.²⁹ Ein Wachstum ist bei 33° C bis 46° C sowie einem pH - Wert zwischen 5,5 und 6,6 möglich.²⁸

Aureobasidium pullulans

Diese Art ist vor allem in Erdreich verbreitet sowie in Innenräumen. Die Fähigkeit von *Aureobasidium pullulans* Cellulose abzubauen, ist ein wirtschaftliche Problem der Holzindustrie. *A. pullulans* ist Allergien auslösend. Des Weiteren wird der Schimmelpilz in der Biotechnologie zur Gewinnung von Kunstfasern sowie als Dickungsmittel in der Lebensmittelindustrie genutzt.³⁰ Sein Wachstum erfolgt zwischen -5° C und 25° C.³¹

Cladosporium cladosporioides

Der Lebensraum von *Cladosporium cladosporioides* liegt vor allem in Wäldern und Sümpfen, jedoch wurde der Schimmelpilz auf Lebensmittel sowie auf Textilien nachgewiesen. Seine Pathogenität verursacht Allergien und Hautinfektionen.³²

²⁷ [URL 8] ²⁹ [URL 11] ³² [URL 14]

²⁷ [URL 9] ³⁰ [URL 12]

²⁸ [URL 10] ³¹ [URL 13]

Cladosporium herbarum

Cladosporium herbarum wird auch als *Davidiella tassiana* bezeichnet. Sein Verbreitungsraum entspricht dem von *Cladosporium cladosporioides*. Bezüglich seiner Pathogenität führt sein Mykotoxin *Gibberelline* zu einer erhöhte Toxizität bei Vögelembryonen und stellt daher für die Tierindustrie eine Belastung dar.^{33,34} Sein Wachstum erfolgt zwischen 18° C und 28° C sowie einem pH - Wert von 4,4 bis 6,0.³⁵

Epicoccum nigrum

Dieser Schimmelpilz gehört wie die Gattung *Alternaria* zu den *Dematiaceae*.^{36,37} *Epicoccum nigrum* ist in der Literatur auch unter den Sekundärnamen *Epicoccum purpurascens* bekannt. Er kommt des Öfteren auf Grassamen sowie Getreidekörnern vor und ist auch auf Textilien und Holz verbreitet. Seine Wachstumsbedingungen liegen zwischen -3 ° C und 44° C. Der pH - Wert des Milieus liegt zwischen 3,0 und 9,0. *Epicoccum nigrum* kann Hautinfektionen und Allergien auslösen.³⁶

Fusarium oxysporum

Fusarium oxysporum ist ein parasitärer Schimmelpilz, der häufig auf Pflanzen vorkommt und somit in Lebensmittel gelangen kann.³⁸ Charakteristisch ist sein schnelles Wachstum und die sichelzellige Morphologie seiner Sporen (siehe Abbildung 3 - 2.1), welche bei allen *Fusarium* - Arten vertreten sind.³⁹ *Fusarium oxysporum* wurde von dem US - Landwirtschaftsministerium als Biowaffe für die Bekämpfung von *Cannabis sativa* (Hanfpflanze) und *Erythroxylon coca* (Cocastrauch) verwendet.^{39, 40}

³³ [URL 15] ³⁶ [URL 18] ³⁹ [Kück 2009]

³⁴ [URL 16] ³⁷ [URL 19] ⁴⁰ [Green 2006]

³⁵ [URL 17] ³⁸ [URL 20]



Abbildung 3 - 2.1 *Fusarium oxysporum* Sporen⁴¹

Dargestellt sind zwei Sporen der *Fusarium* - Arten. Zuerkennen ist seine sichelzellige Form, welche sich von den Sporen der *Alternaria* - Gattungen unterscheidet.

Fusarium solani

Dieser Schimmelpilz besitzt wie *Fusarium oxysporum* ein parasitäres Verhalten. Seine Besonderheit ist die teleomorphe Fortpflanzung.⁴² Da *Fusarium solani* durch den Befall von Futtermitteln aufgenommen werden kann, sind Erkrankungen wie *Endophthalmitis*⁴³ und *Keratitis*⁴⁴ möglich.⁴⁵ Sein Wachstum erfolgt bei 27° C bis 31° C und einem zu Grunde liegenden pH - Wert von 7 bis 8.⁴²

Mucor mucedo

Mucor mucedo wird vor allem in Ausscheidungen gefunden. Eine taxonomische Klassifizierung ist schwierig, da dieser Schimmelpilz morphologisch nicht von andern Vertretern der Gattung *Mucor* unterschieden werden kann. Neben molekularbiologischen Ansätzen der Differenzierung von *Mucor mucedo* sind Wachstumsunterschiede

⁴¹ [Kück 2009] ⁴⁵ [URL 22]

⁴² [URL 21]

⁴³ Entzündung des inneren Auges durch Mikroorganismen [Kampik 2005]

⁴⁴ Entzündung der Hornhaut durch Mikroorganismen [BVA 2011]

bezüglich der Temperatur als Klassifizierungsmerkmal möglich. *Mucor mucedo* wächst im Vergleich zu seinen Artverwandten nicht bei einer Temperatur über 37° C. Neben seiner asexuellen Fortpflanzung ist auch eine sexuelle Fortpflanzung möglich.⁴⁶ *Mucor mucedo* ist verantwortlich für Hausstauballergien sowie dem Befall der Haut und Atemwege.⁴⁷ Ebenso wie *Aureobasidium pullulans* kann *Mucor mucedo* Cellulose zersetzen, was wirtschaftliche Schäden für die Holz - und Papierindustrie zur Folge hat. *Mucor mucedo* wächst zwischen 5° C und 22° C.⁴⁶

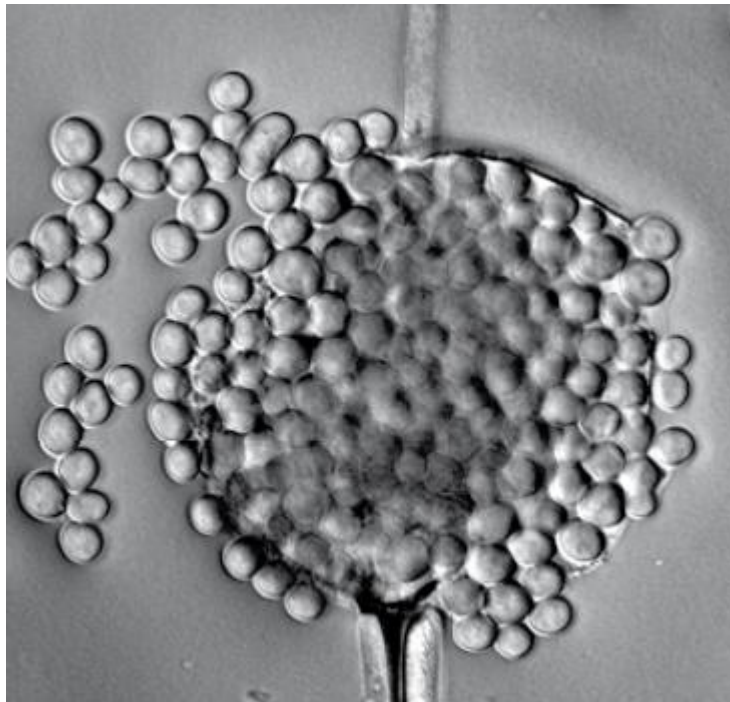


Abbildung 4 - 2.1 *Mucor mucedo* Sporen⁴⁶

Diese Abbildung zeigt austretende Sporen (kugelförmig) von *Mucor mucedo*.

Penicillium chrysogenum

Diese Art gehört zu den *Ascomyceten* (Schlauchpilzen). Aktuell sind etwa 230 *Penicillium* - Arten bekannt. Im Vergleich zu anderen Gattungen wie *Mucor* lässt sich *Penicillium* morphologisch unterscheiden. Diese Differenzierung ist durch die unterschiedlichen charakteristischen Verzweigungen der Sporenträger möglich.⁴⁶ Seine Verbreitung beschränkt sich auf Lebensmittel sowie dem Hausstaub. *Penicillium chrysogenum* ist verantwortlich für Atemwegserkrankungen und Allergien. In

⁴⁶ [Kück 2009]

⁴⁷ [URL 22]

biotechnologischen Verfahren wird *Penicillium chrysogenum* für die Herstellung des Antibiotikum *Penicillin* verwendet.⁴⁸ Ein Wachstum erfolgt zwischen 5° C und 30° C. Das Milieu besitzt einen pH - Wert zwischen 5,5 und 6,5, wenn ein Wachstum für *Penicillium chrysogenum* möglich ist.⁴⁹

Penicillium funiculosum

Dieser Schimmelpilz ist häufig auf tropischen Getreidesorten sowie Früchten zu finden.⁵⁰ Seine *Cellulase* ermöglicht die Spaltung von *Lignocellulose*, was Bestandteil der Zellwand in Bäumen ist. Ein Wachstum erfolgt bei einer Temperatur von 8° C bis 42° C sowie einem zu Grunde liegenden pH - Wert zwischen 5,5 und 6,5.^{50, 51}

Penicillium glaucum

Penicillium glaucum ist ein industriell genutzter Schimmelpilz für die Herstellung von Blaukäse.⁵² Es wird vermutet, dass es sich eigentlich um den Schimmelpilz *Penicillium roqueforti* handelt.⁵³ Des Weiteren existiert für *Penicillium glaucum* kein taxonomischer Eintrag auf dem *taxonomy browser* des *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*.^{54,55} Für *Penicillium glaucum* existieren so gut wie keine Literaturverweise.

Trichoderma harzianum

Trichoderma harzianum kommt im Erdreich, abgestorbenen Pflanzenteilen sowie auf Papier und Textilien vor. In den seltensten Fällen kann *Trichoderma harzianum* Allergien auslösend sein. Ein Wachstum erfolgt bei 15° C bis 36° C.⁵⁶

Trichoderma viride

Trichoderma viride ist der weltweit verbreitetste Erdschimmelpilz. Durch seine hohe Zellaktivität erfolgt ein schnelles Wachstum auf Holz und Papier sowie Innenräumen.⁵⁷ Durch die hohe Celluloseabbaurate wird er in industriellen Verfahren der Biotechnologie zur Herstellung von *Cellulase*, *Glucoamylase* und *Pektinase* verwendet. *Trichoderma viride* besitzt eine hohe Ähnlichkeit zu *Trichoderma harzianum* und lässt sich nur durch

⁴⁸ [URL 23]

⁵⁰ [URL 24]

⁵² [Duchesnes 2013]

⁵⁴ [Sayers 2008]

⁵⁶ [URL 30]

⁴⁹ [URL 26]

⁵¹ [URL 25]

⁵³ [URL 27]

⁵⁵ [Benson 2009]

⁵⁷ [URL 19]

seine rauen Konidienträger im Vergleich mit den glatten Konidienträger von *Trichoderma harzianum* unterscheiden. *Trichoderma viride* kann Atemwegserkrankungen sowie Allergien auslösen.⁵⁸ Des Weiteren ist *Trichoderma viride* ein Teleomorph.⁵⁹ Sein Wachstum erfolgt bei einer Temperatur von 0° C bis 37° C und einem zu Grunde liegenden pH - Wert von 5 - 6.⁵⁸

Zusammenfassung der Schimmelpilze

Die folgende Tabelle soll die vorgestellten Schimmelpilze bezüglich artverwandter morphologischer Unterscheidung, Pathogenität und Wachstumsbedingungen zusammenfassen.

Tabelle 1 - 2.1 Zusammenfassung der zu untersuchenden Schimmelpilze

Die morphologische Unterscheidung bezieht sich auf die einzelnen Gattungen mit der Frage, ob sich deren Arten morphologisch differenzieren. Die Pathogenität wird durch im Einzelfall auftretende Erkrankungen (gering) sowie häufigen Erkrankungen der Atemwege bzw. Allergien (normal) und den Entwicklungen von lebensgefährlichen Infektionen (hoch) klassifiziert. Sind keine Informationen vorhanden, wurde dies durch ein x gekennzeichnet.

⁵⁸ [URL 28] ⁵⁹ [URL 29]

| Organismus | Morphologische Unterscheidung | Pathogenität | Temperatur In ° C | pH - Wert |
|-------------------------------------|-------------------------------|--------------|----------------------|-----------|
| <i>Alternaria alternata</i> | x | normal | 2,5 - 32,0 | 2,7 - 8,0 |
| <i>Alternaria tenuissima</i> | x | normal | 6,0 - 28,0 | 5,0 |
| <i>Aspergillus glaucus</i> | nein | normal | x | x |
| <i>Aspergillus niger</i> | nein | gering | 17,0 - 42,0 | 5,5 - 6,5 |
| <i>Aspergillus penicillioides</i> | nein | gering | x | x |
| <i>Aspergillus versicolor</i> | nein | hoch | 4,0 - 40,0 | 5,5 |
| <i>Aspergillus vitis</i> | nein | gering | 33,0 - 46,0 | 5,5 - 6,5 |
| <i>Aureobasidium pullulans</i> | x | normal | x | x |
| <i>Cladosporium cladosporioides</i> | x | normal | -5,0 - 25,0 | x |
| <i>Cladosporium herbarum</i> | x | hoch | 18,0 - 28,0 | 4,4 - 6,0 |
| <i>Epicoccum nigrum</i> | x | normal | -3,0 - 44,0 | 3,0 - 9,0 |
| <i>Fusarium oxysporum</i> | nein | normal | x | x |
| <i>Fusarium solani</i> | nein | hoch | 27,0 - 31,0 | 7,0 - 9,0 |
| <i>Mucor mucedo</i> | nein | normal | 5,0 - 22,0 | x |
| <i>Penicillium chrysogenum</i> | ja | normal | 5,0 - 30,0 | 5,5 - 6,5 |
| <i>Penicillium funiculosum</i> | ja | normal | 8,0 - 42,0 | 5,5 - 6,5 |
| <i>Penicillium glaucum</i> | x | x | x | x |
| <i>Trichoderma harzianum</i> | ja | gering | 15,0 - 36,0 | x |
| <i>Trichoderma viride</i> | ja | gering | 0,0 - 37,0 | 5,0 - 6,0 |

Anschließend werden die ausgewählten Marker vorgestellt.

Kapitel 2.2 Ausgewählte sequenzielle Marker

In diesem Unterkapitel werden im Folgenden die verwendeten Marker für die spätere Etablierung eines Bestimmungsschlüssels durch phylogenetische Analysen vorgestellt. Die Marker wurden durch die in Kapitel 1 vorgestellten Forschungsgruppen ausgewählt.

Internal transcribed spacer (ITS)

Der *Internal transcribed spacer* ist eine Intron - Region nicht codierender Abschnitte der ribosomalen RNA (rRNA). Der *Internal transcribed spacer* wird dabei in zwei Regionen unterschieden, der *ITS1* - und *ITS2* - Region. Die beiden Abschnitte trennen dabei die

konservierten *18S* -, *5,8S* - und *28S* - Regionen der rRNA.⁶⁰ Die *ITS* - Regionen sind hoch variabel sowie der häufigste sequenzierte Bereich von Schimmelpilzen und werden daher als sequenzieller Marker zur Unterscheidung von artverwandten Schimmelpilzen angesehen.⁶¹ Die Sequenzlänge der *ITS1* - Region beträgt etwa 260 bp, der *ITS2* - Region etwa 220 bp.⁶²



Abbildung 5 - 2.2 Internal transcribed spacer

Schematisch dargestellt ist ein Ausschnitt der rRNA bezüglich der *ITS* -, *18S* -, *5,8S* - und *28S* - Region. Die Farben dienen der Hervorhebung der unterschiedlichen Abschnitte. Grün dargestellt sind die beiden *ITS* - Regionen

In den Publikationen von Henry⁶³, Guarro⁶⁴ und Matheny⁶⁵ erfolgt eine zusammenhängende Betrachtung der *ITS1* - und *ITS2* - Region für die Unterscheidung von Schimmelpilzen. Ob es sich dabei um eine Konkatenation der *ITS* - Sequenzen handelt oder die *5,8S* - rRNA - Sequenz enthalten ist, kann nicht nachvollzogen werden. Da eine zusammenhängende Betrachtung beider Regionen nicht immer eine Unterscheidung der artverwandten Schimmelpilze ermöglicht, wird in dieser Arbeit die *ITS1* - und *ITS2* - Region separat betrachtet. Die *ITS1* - Region ist bezüglich der Artenunterscheidung für die Gattung *Mucor* ungeeignet.⁶⁶

RNA - Polymerase II (RPB2)

Dieser Marker codiert die zweite Untereinheit der *RNA - Polymerase II* und ist elementar für die Transkription von DNA zu RNA.⁶⁷ Des Weiteren besitzt *RPB2* eine codierende Region für nicht codierende RNAs, wodurch vermutet wird, dass diese Region für die Transkripte hoch variabel und für die Unterscheidung von Schimmelpilzen relevant ist.⁶⁸ Verglichen mit anderen Markern wie dem *Elongation - Faktor 1* ist vor allem die Intron - Regionen des *RPB2* - Markers hoch konserviert.⁶⁵

⁶⁰ [Leppchen 2014]

⁶³ [Henry 2000]

⁶⁶ [Lu 2013]

⁶¹ [Schoch 2012]

⁶⁴ [Guarro 1999]

⁶⁷ [Acker 1992]

⁶² [Sang 1995]

⁶⁵ [Matheny 2007]

⁶⁸ [Kershner 1998]

Die Betrachtung des Markers in dieser Arbeit erfolgt sequenziell für Exon - und Intron - Regionen, da eine Separierung der Regionen wegen der Datengrundlage nicht möglich war. Des Weiteren war eine Separierung zwischen Untereinheit und nicht codierender RNA aus selbigen Grund nicht möglich.

Elongation - Faktor 1 (TEF1)

TEF1 ist ein hoch konserviertes Protein und wird zur phylogenetischen Unterscheidung als Standard - Marker verwendet.⁶⁹ Dieses Protein leitet die Transaktivierung einer Vielzahl an Genen und ist als transkriptionaler Repressor bekannt. Phylogenetische Unterscheidungen sind besonders durch die Länge der *TEF1* - Sequenzen möglich (ca. 80 - 500bp).^{70, 71} *TEF1* hat eine essenzielle Bedeutung im *Hippo signaling - Pathway*. Dieser *Pathway* ist an dem Organwachstum sowie der Tumorsuppression beteiligt. Des Weiteren ist *TEF1* bei der *Guanosintriphosphat* - Bindung an der *Aminoacyl - tRNA* während der Translation beteiligt.^{72, 73}

Der *Elongation - Faktor 1* ist vor allem in den Konidien der Schimmelpilzen zu finden.⁷⁴ *TEF1* besitzt drei hoch konservierte Intron - Regionen, welche mit der zusätzlichen Betrachtung des Markers *Chitinase* zu einer phylogenetischen Unterscheidung von *Trichoderma* - Arten führen.^{75, 76}

Beta - Tubulin (TUB2)

Beta Tubulin wird in sechs Subklassen unterschieden, welche sich in der Proteinsequenz stark unterscheiden.⁷⁷ *Beta - Tubulin* sowie *Alpha - Tubulin* sind an dem Aufbau der Mikrotubuli zur Bildung des Zytoskeletts eukaryotischer Zellen beteiligt. Beide Tubuline bilden ein Heterodimer - Komplex. Des Weiteren ist *TUB2* für die Bindung von *Guanosintriphosphat* verantwortlich. In Interaktion mit *Dyneine* und weiteren Tubuline werden interzelluläre Transporte von Stoffen ermöglicht. In der chromosomalen Segregation ist *TUB2* für die Teilung der Chromosomen mit verantwortlich.^{78,79}

TUB2 besitzt fünf hoch konservierte Intron - Regionen. Diese eignen sich durch zusätzliche Verwendung von *Aktin* und *TEF1* zur phylogenetischen Unterscheidung von Eukaryonten.^{80,81,82} *Beta - Tubulin* ist für die Artenunterscheidung von *Penicillium*, speziell für teleomorphe und nicht teleomorphe Arten geeignet.⁸³

⁶⁹ [Roger]

⁷² [Zhang 2009] ⁷⁵ [Kitamoto 1998]

⁷⁸ [Faguy 1998]

⁸¹ [Brown]

⁷⁰ [URL 31]

⁷³ [Zhao 2008] ⁷⁶ [Zelazowska 2007]

⁷⁹ [Kinzel 2010]

⁸² [Begerow 2004]

⁷¹ [URL32]

⁷⁴ [Gravelat 2008] ⁷⁷ [Lecine 2000]

⁸⁰ [Einax 2003]

⁸³ [Kim 2008]

Topoisomerase II (TOP2)

Die *Topoisomerase II* gehört zu den Isomerasen. Dieses Protein, welches zur Spaltung von DNA - Doppelsträngen dient und für die Transkription unerlässlich ist, wird in allen Organismen als omnipräsent betrachtet, da es sowohl in Eukaryonten und Prokaryoten vorkommt.⁸⁴ *TOP2* besteht aus mehreren Untereinheiten, welche für die Katalyse *ATP* benötigen.⁸⁵ Eine Verwendung der *Topoisomerase II* als sequenzieller Marker für die phylogenetische Analyse wird in der Literatur nicht benannt.

Aktin (ACT)

Aktin ist ein strukturgebendes globuläres Protein, das sich im Zytoskelett und Muskelfasern finden lässt. Durch Interaktion mit *Myosin* kommt es zu Muskelkontraktionen in höher entwickelten Organismen. *Aktin* kommt in drei Isoformen vor. Es wird daher in *Alpha* -, *Beta* - und *Gamma* - *Aktin* unterschieden.⁸⁶ Für die Betrachtung der Schimmelpilze ist nur *Beta* - und *Gamma* - *Aktin* von Relevanz.⁸⁷ *Aktin* hat in Schimmelpilzen eine zusätzliche Funktion. Es reguliert die Organisation der chromosomalen Segregation. *Aktin* ist in Eukaryonten hoch konserviert und daher für phylogenetische Unterscheidungen geeignet.^{87, 88, 89}

Des Weiteren wird *Aktin* als Marker für die Unterscheidung von *Acytosteliaceae* und *Dictyosteliaceae* verwendet.⁹⁰ Die Intron - Regionen besitzen in Eukaryonten nur eine geringe Sequenzidentität. In Kombination mit *TEF1* ist *Aktin* als Marker für Schimmelpilze, speziell für die Unterscheidung von *Trichoderma* und *Aspergillus* - Arten, geeignet.⁹¹

Anmerkung: Durch die Forschungsgruppen wurden des Weiteren die Marker *Chitinase* und *alkaline Protease* ausgewählt. Diese werden aber im weiteren Verlauf der Masterarbeit vernachlässigt, da es für diese Marker keine Datengrundlage bezüglich der vorgestellten Schimmelpilze gibt.

⁸⁴ [URL 33]

⁸⁶ [URL 35]

⁸⁸ [Bray 1973]

⁹⁰ [Swanson 2002]

⁸⁵ [URL 34]

⁸⁷ [Zechel 1978]

⁸⁹ [Keeling]

⁹¹ [Drouin 1995]

Kapitel 3 Generierung und Aufbereitung des DNA - Sequenzdatensatzes

Dieses Kapitel erklärt die Generierung des DNA - Sequenzdatensatzes sowie dessen Aufbereitung, was die Grundlage für die späteren phylogenetischen Analysen und der damit verbundenen Etablierung der Bestimmungsschlüssel darstellt. Des Weiteren erfolgt eine Einschätzung über die Qualität des Datensatzes bezüglich der enthaltenen Sequenzen.

Kapitel 3.1 Generierung des Datensatzes

Für die Recherche der Sequenzdaten wurde für die *ITS1* - Sequenzen die *BOLD* - Datenbank (*Barcode of Life Data Systems*) verwendet.^{92, 93} Die Datenbank verwendet das Prinzip des *Barcoding*. Dies bedeutet, dass jedem Organismus eine spezifische DNA - Sequenz zugeordnet wurde, durch welche eine Bestimmung des Organismus möglich ist. In diesem Fall werden Schimmelpilze auf der *BOLD* durch die *ITS1* - Region charakterisiert. Es ist definiert, dass die *ITS1* - DNA - Sequenz eine Mindestlänge von 100bp besitzen muss. Da nicht alle ausgewählten Schimmelpilze auf der *BOLD* vertreten sind, wurde eine zusätzliche Recherche für die *ITS1* - Sequenzen durchgeführt. Dafür wurde die *ITS2 Database* verwendet.^{94, 95} Die gefundenen Einträge verwiesen auf die Datenbank des *NCBI*, speziell die auf die *GenBank*, von welcher die zusätzlichen DNA - Sequenzen anschließend entnommen wurden.^{96, 97} Für die Recherche der *ITS2* - Region wurde die *ITS2 Database* sowie die Datenbank des *NCBI* verwendet.

Eine Recherche für die Marker *RPB2*, *TUB2*, *ACT*, *TOP2*, *TEF1*, *ALP* und *CHIT1* erfolgte auf der *GenBank*. Für einen möglichst umfassenden Datensatz wurde die Recherche nach den Markersequenzen auf die Sekundärnamen der Schimmelpilze ausgeweitet, da bei einzelnen Schimmelpilzen keine DNA - Sequenzdaten unter den Primärnamen gefunden wurden.

Bei der Extrahierung der Sequenzdaten aus den *Flat* - *Files* der *Genbank* wurde eine Separierung der Sequenzen bezüglich Exon - Sequenzen und Intron - Exon - Sequenzen durchgeführt, wenn die Datengrundlage dies zuließ. Diese Separierung erfolgte für *ACT*,

⁹² [Ratnasingham 2007]

⁹³ URL: <http://www.boldsystems.org/>

⁹⁴ [Merget 2012]

⁹⁵ URL: <http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de/>

⁹⁶ [Benson 2008]

⁹⁷ URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

TUB2 und *TEF1*. Die DNA - Sequenzen wurden unter Berücksichtigung des Schimmelpilzes und des Markers als *Fasta* - Datei hinterlegt. Diese Dateien repräsentieren den Datensatz. Zusätzlich wurde auch das *Flate* - *File* für eine spätere Datenrückverfolgung zu jeder Sequenz hinterlegt.

Kapitel 3.2 **Aufbereitung des Datensatzes**

Nach der Generierung des Datensatzes wurde dieser aufbereitet. Da auf der *Genbank* redundante Sequenzen hinterlegt sind, mussten diese aus dem Datensatz gefiltert und entfernt werden. Des Weiteren wurde der Datensatz mit einem Teilwortfilter bearbeitet. Ein Teilwort ist DNA - Sequenz, welche mit einer 100%igen Identität in einer andern DNA - Sequenz enthalten ist. Diese Teilwortsequenzen wurden zusätzlich entfernt. Die Aufbereitung erfolgte für eine lokale Betrachtung des Datensatzes. Dies bedeutet, dass redundante Sequenzen für einen Schimmelpilz bezüglich des dazu gehörigen Markers entfernt wurden. Des Weiteren musste die Grenze für die Mindestlänge der DNA - Sequenzen überprüft werden. Die Mindestlänge wurde auf 30bp festgelegt. Die Festlegung einer höheren Grenze war nicht möglich, da andernfalls mehrere Schimmelpilze für spätere phylogenetische Analyse nicht berücksichtigt werden könnten (z.B. *Aspergillus glaucus ITS1*).

Die folgende Tabelle zeigt eine Übersicht des aufbereiteten Datensatzes, welcher in späteren Analysen als Grundlage fungiert.

Tabelle 2 - 3.2 Übersicht des Datensatzes

Diese Tabelle repräsentiert den aufbereiteten Datensatz. Dargestellt ist die Anzahl an Sequenzen für den jeweiligen Marker mit dazugehörigem Schimmelpilz. Zellen mit einer Null zeigen, dass für den jeweiligen Schimmelpilz und Marker keine DNA - Sequenzen durch die zuvor erklärte Recherche gefunden wurden. Sonstige bezifferte Zellen repräsentieren das *Fasta* - *File*, welches die Sequenzen enthält. In Klammer geschriebene Zahlen beschreiben die Anzahl an Exon - Sequenzen. Die davor stehende Zahl repräsentiert die Intron - Exon - Sequenzen.

| | <i>ITS1</i> | <i>ITS2</i> | <i>TUB2</i> | <i>ACT</i> | <i>TEF1</i> | <i>RPB2</i> | <i>TOP2</i> | <i>ALP</i> |
|--|-------------|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|------------|
| <i>Alternaria alternata</i> | 14 | 11 | 20 (15) | 0 | 1 | 7 | 0 | 0 |
| <i>Alternaria tenuissima</i> | 11 | 6 | 7 (6) | 0 | 1 | 6 | 0 | 0 |
| <i>Aspergillus glaucus</i> | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| <i>Aspergillus niger</i> | 14 | 29 | 18 (10) | 0 | 1 | 1 | 1 (1) | 0 |
| <i>Aspergillus penicillioides</i> | 2 | 4 | 3 (3) | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| <i>Aspergillus versicolor</i> | 6 | 20 | 12 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 |
| <i>Aspergillus vitis</i> | 6 | 5 | 2 (2) | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| <i>Aureobasidium pullulans</i> | 5 | 17 | 18 (18) | 0 | 1 (1) | 10 | 0 | 0 |
| <i>Cladosporium cladosporioides</i> | 10 | 10 | 3 | 16 (4) | 31 (18) | 1 | 0 | 0 |
| <i>Cladosporium herbarum</i> | 5 | 3 | 1 (1) | 5 (2) | 8 (5) | 1 | 0 | 0 |
| <i>Epicoccum nigrum</i> | 8 | 13 | 7 (5) | 4 (2) | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Fusarium oxysporum</i> | 15 | 17 | 41 (22) | 0 | 17 (4) | 6 | 5 | 0 |
| <i>Fusarium solani</i> | 5 | 9 | 65 (28) | 0 | 8 (4) | 3 | 1 | 0 |
| <i>Mucor mucedo</i> | 6 | 5 | 1 (1) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Penicillium chrysogenum</i> | 14 | 23 | 22 (11) | 2 (1) | 0 | 6 | 1 | 1 (1) |
| <i>Penicillium funiculosum</i> | 3 | 11 | 1 (1) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Trichoderma harzianum</i> | 8 | 12 | 4 (2) | 12 (3) | 26 (6) | 22 | 0 | 0 |
| <i>Trichoderma viride</i> | 5 | 6 | 2 (3) | 0 | 9 (5) | 1 | 0 | 0 |

Für den Marker *CHIT1* wurden keine Sequenzdaten gefunden. Dieses Ergebnis verhält sich ähnlich zu den Marker *ALP*, wofür sich nur eine DNA - Sequenz finden ließ. Besonders fällt der Schimmelpilz *Penicillium glaucum* auf. Für diesen gibt es keine Datengrundlage und keinen taxonomischen Eintrag wie in Kapitel 2.1 beschrieben. Es stellt sich die Frage, ob dieser Organismus überhaupt unter diesem Namen existiert. Für die späteren Analysen entfallen daher die Marker *ALP* sowie *CHIT1* und der Schimmelpilz *Penicillium glaucum*.

Die Ergebnisse einer anschließenden globalen Redundanzsuche für einen Marker über alle Schimmelpilze werden in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

Tabelle 3 - 3.2 globale Redundanz für alle Schimmelpilze

In dieser Tabelle werden redundante Sequenzen dargestellt. Diese werden durch ihre ID 's, Schimmelpilznamen und Marker charakterisiert. Die Tabelle wird in Zeilen gelesen, was bedeutet, dass *>510947866 A.tenuissima TEF1* redundant zu *>510947748 A.alternata TEF1* ist. Im Datensatz beträgt die Anzahl an redundanten Sequenzen immer zwei.

| | |
|---|--|
| <i>>510947866 A.tenuissima TEF1</i> | <i>>510947748 A. alternata TEF1</i> |
| <i>>223636042 A. tenuissima ITS1</i> | <i>>AF404664.1 A. alternata ITS1</i> |
| <i>>AY154710.1 A. tenuissima ITS1</i> | <i>>311765874 A. alternata ITS1</i> |
| <i>>390985587 A. alternata RPB2</i> | <i>>390985591 A. tenuissima RPB2</i> |
| <i>>390985585 A. alternata RPB2</i> | <i>>390985597 A. tenuissima RPB2</i> |
| <i>>308210646 E. nigrum ITS2</i> | <i>>313574881 A. penicillioides ITS2</i> |
| <i>>HM130688.1 A. pullulans ITS2</i> | <i>>28974014 C. herbarum ITS2</i> |
| <i>>5327273 T. harzianum ITS2</i> | <i>>5327284 T. viride ITS2</i> |
| <i>>401802607 A. alternata TUB2 - Exon</i> | <i>>401802625 A. tenuissima TUB2 - Exon</i> |
| <i>>15530089 A. alternata TUB2 - Exon</i> | <i>>15530065: A. tenuissima TUB2 - Exon</i> |
| <i>>15530111 A. tenuissima TUB2</i> | <i>>15530089 A. alternata TUB2</i> |
| <i>>401802625 A. tenuissima TUB2</i> | <i>>401802609 A. alternata TUB2</i> |

Es zeigt sich, dass vor allem *Alternaria alternata* sowie *Alternaria tenuissima* redundante Sequenzen bezüglich der Marker *TEF1*, *ITS1*, *RPB2*, *TUB2*, *TUB2 - Exon* besitzen. Daher wird an dieser Stelle bereits vermutet, dass eine Unterscheidung beider Arten durch diese Marker nicht möglich sein wird. Des Weiteren erfolgte eine globale Betrachtung für sequenzielle Teilwörter. Es zeigte sich, dass diese Teilwörter für alle Schimmelpilze in den Markern *ITS1* und *ITS2* existieren. Problematisch ist, dass diese

Teilwörter nicht nur bei gattungsgleichen Schimmelpilzen auftreten sondern auch gattungsübergreifend sind, was eine spätere Aussagekraft für die phylogenetischen Untersuchungen bezüglich der *ITS1* - und *ITS2* - Marker mindert. Eine Darstellung der globalen Teilwörter ist auf der beigelegten CD zu entnehmen.

Der aufbereitete Datensatz wurde anschließend für Frau Fröbel' s Datenbank zur Verfügung gestellt.

Kapitel 3.3 Vergleich zwischen Literatur und dem Datensatz

In diesem Unterkapitel wird diskutiert, ob sich die Schimmelpilze durch die sequenziellen Marker charakterisieren lassen durch einen Vergleich mit der Literatur (siehe Kapitel 2.2) und dem generierten Datensatz.

Es wurde beschrieben, dass *Mucor* - Arten durch ihre *ITS* - Region schlecht unterscheidbar sind. Daher wird vermutet, dass die *ITS* - Regionen als Marker für die Trennung von *Mucor* zu andern Gattungen genutzt werden können. Um *Mucor* - Arten unterscheiden zu können, bliebe der *TUB2* - Marker als Alternative. Für *Trichoderma* - Arten wurde beschrieben, dass die Marker *TEF1* und *CHIT1* in Kombination für die Artentrennung geeignet sind. Laut Datensatz müsste diese Trennung durch Kombination eines anderen Markers statt *CHIT1* erfolgen, da dieser nicht im Datensatz vertreten ist. Des Weiteren beschrieb Won Ki Kim⁹⁸ in der Literatur, dass durch Nutzung des Markers *TUB2* *Penicillium funiculosum* und *Penicillium chrysogenum* differenzierbar sind. Da für beide Schimmelpilze Sequenzen für den Marker *TUB2* existieren, ist eine solche Artentrennung durchaus möglich und erfolgt dabei in einer Intron - Exon - sowie Exon - Separierung. Die Gattungen *Trichoderma* und *Aspergillus* sollen durch die Marker *ACT* und *TEF1* charakterisierbar sein. Diese Differenzierung wird nicht durch diese Marker möglich sein, da es keine Datengrundlage für die Schimmelpilze bezüglich der Marker gibt. In diesem Fall müssen die *ITS* - Regionen sowie das *Beta - Tubulin* eine Unterscheidung ermöglichen.

⁹⁸ [Kim 2008]

Kapitel 4 Vorstellung der verwendeten bioinformatischen Algorithmen und Tools

Dieses Kapitel beschäftigt sich mit der Vorstellung der Tools *MEGA 6* und *Consensus Maker* sowie der Algorithmen *ClustalW*, *Muscle*, *Neighbor - Joining* und *UPGMA* für die phylogenetische Untersuchung der Schimmelpilze. Die Algorithmen wurden in verschiedenen Ansätzen verwendet, um eine Vergleichbarkeit der phylogenetischen Bäume und der multiplen Sequenzalignments zu ermöglichen. Der Aufbau und Verlauf der verschiedenen Ansätze sowie die jeweiligen Parametereinstellungen werden im Kapitel 5 beschrieben.

Die Wahl der Algorithmen, welche für die Analyse verwendet wurden, erfolgte auf Grund der in der Literatur beschriebenen Verfahrensweise von beispielsweise Brown, Drouin und Einax.^{99, 100, 101}

Kapitel 4.1 Der *ClustalW* - Algorithmus

Für die phylogenetische Untersuchung der Schimmelpilze wurde ein Multiples - Sequenz - Alignment (MSA) ausgeführt, um somit konservierte Regionen innerhalb der DNA - Sequenzen zu finden. Ziel ist es, damit die Schimmelpilze zu charakterisieren. Zu Beginn eines MSAs erfolgte ein globales Alignment für die Berechnung eines paarweisen Scores der zu vergleichenden DNA - Sequenzen. Dem liegt eine Substitutionsmatrix sowie ein *Gap - Cost* - Model zugrunde. Der paarweise Vergleich bildet die Grundlage für das MSA. Durch ein iteratives Vorgehen werden dem MSA weitere paarweise alignierte Sequenzen hinzugefügt. Problematisch ist, dass die Qualität des berechneten MSAs abhängig von der Reihenfolge der zu alignierenden Sequenzen ist.¹⁰² Anschließend wurde aus den Scores (S) eine paarweise Distanzmatrix erstellt.¹⁰³

Die Distanz (D) ergibt sich durch die Gleichung:

$$D = 1 - \frac{S}{100} \quad (1)$$

Da an dieser Stelle kein Informationsgehalt der bewerteten paarweise Alignments unter Berücksichtigung der anderen paarweisen Alignments existiert, muss hierfür ein progressives Alignment durch *ClustalW* erfolgen. Zu Beginn wird ein Initialbaum aus den

⁹⁹ [Brown]

¹⁰¹ [Einax 2003]

¹⁰³ [Merkel 2009]

¹⁰⁰ [Drouin 1995]

¹⁰² [Olijar 2013]

zuvor paarweise alignierten Sequenzen unter Verwendung des *Neighbor - Joining* - Algorithmus berechnet.¹⁰⁴ Dabei wird mit dem Sequenzpaar, welches die geringste Distanz zueinander hat, begonnen. Durch ein weiteres iteratives Vorgehen wird dieser Baum aufgefüllt und die sich ergebende Gesamtlänge jeder Sequenz berechnet. Für eine Bewertung des MSAs müssen zusätzliche Substitutionsmatrizen sowie ein weiteres *Gap - Cost* - Model hinzugefügt werden. Die Gesamtlängen werden dabei als Wichtung der Substitutionsmatrizen verwendet. Sequenzen, die eine große Distanz zueinander aufweisen, besitzen demnach auch einen hohen Score.¹⁰⁴ Gaps, welche bereits im paarweisen Alignment eingefügt wurden, müssen innerhalb des progressiven Alignments berücksichtigt werden. Durch ClustalW wird versucht, eine Wichtung durch unterschiedliche Substitutionsmatrizen sowie positionsspezifische Kostenfunktionen für die Erweiterung und Einführung der Gaps für eine Fehlerminimierung zu etablieren. Dies geschieht, da Sequenzen mit geringerer Identität zur Berechnung eines fehlerhaften MSAs führen können.^{104,105} Im Folgenden wird der Algorithmus grafisch zusammengefasst:

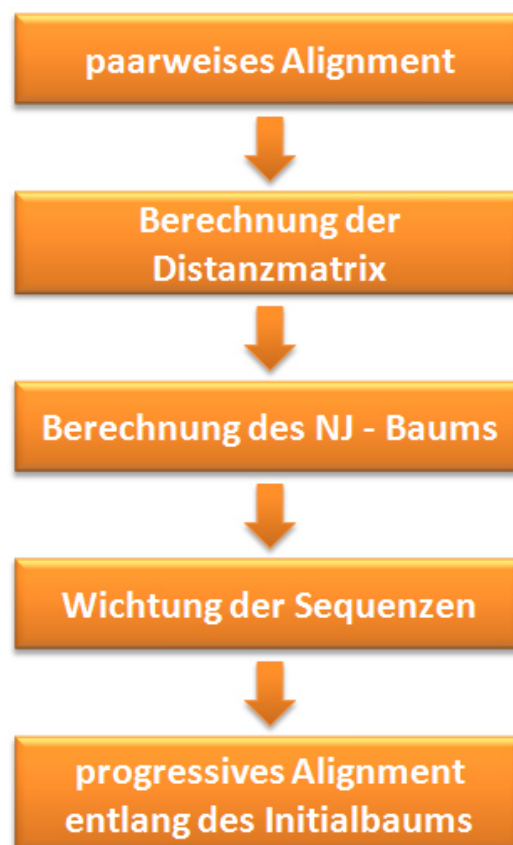


Abbildung 6 - 4.1 schematische Darstellung von *ClustalW*

Diese Abbildung fasst den oben vorgestellten *ClustalW* - Algorithmus für die Berechnung eines MSAs schematisch zusammen.

¹⁰⁴ [Thompson] ¹⁰⁵ [Merkel 2009]

Kapitel 4.2 Der *Muscle* - Algorithmus

Als alternativer Ansatz für die Berechnung des Multiplen - Sequenz - Alignments wurde zusätzlich der *Muscle* - Algorithmus (*multiple sequence comparison by logexpectation*) verwendet. Ziel des Algorithmus ist, die wiederholte Berechnung des MSAs bis keine Verbesserungen mehr bezüglich des *sum - of - pairs - Scores* möglich sind.¹⁰⁶ Zu Beginn wird für jedes Sequenzpaar des Datensatzes eine *k - mer* - Distanz berechnet. Zu diesem Zeitpunkt sind die DNA - Sequenzen noch unaliniert. Hierfür erfolgt eine Zerlegung der Sequenzen in *k - mere*. Ähnliche Sequenzen besitzen mehr identische *k - mere* als unähnliche Sequenzen. Die *k - mer* - Distanz wird durch ein vereinfachtes Alphabet bestimmt. Diese Alphabete definieren bestimmte Klassen der Nukleotide bzw. Aminosäuren.^{107, 108} Für die zugrunde liegende DNA konnte keine Darstellung der Alphabete bezüglich der *k - mer* - Distanz gefunden werden. Im Folgenden wird die Formel zur Berechnung der Distanz beschrieben.

$$d_{X,Y} = \frac{\sum_T \min(n_X(T), n_Y(T))}{\min(l_X, l_Y) - k + 1} \quad (2)$$

Die Variablen *X* und *Y* repräsentieren das jeweilige DNA - Sequenzpaar. $N_X(T)$ sowie $n_Y(T)$ beschreiben die Häufigkeit des jeweiligen *k - mer*'s. Die Länge der *k - mere* ist durch die Variable *k* definiert. Die Länge der DNA - Sequenz wird durch die Variable *l* beschrieben.¹⁰⁹

Aus den berechneten Distanzen wird nun eine Distanzmatrix erstellt, welche durch den *UPGMA* - Algorithmus zu einem suboptimalen binären Baum berechnet wird. Aus diesem Baum wird anschließend ein progressives Alignment (*MSA*) unter Verwendung *Kimura* - Distanz erzeugt (siehe Formel (3)). Die *Kimura* - Distanz wird im Vergleich zur *k - mer* - Distanz aus dem MSA berechnet, wodurch eine weitere Distanzmatrix ermittelt und durch den *UPGMA* - Algorithmus zu einem Baum konstruiert wird. Bei der *Kimura* - Distanz wird die paarweise Identität der alignierten Sequenzen unter Betrachtung der Transition - / Transversion - Substitutionen berechnet.¹¹⁰

$$d = \frac{1}{2} \ln(w_1) - \frac{1}{4} \ln(w_2) \quad (3)$$

$$w_1 = 1 - 2P - Q \quad (4)$$

$$w_2 = 1 - 2Q \quad (5)$$

¹⁰⁶ [Oljar 2013]

¹⁰⁸ [Edgar_2 2004]

¹¹⁰ [Kimura]

¹⁰⁷ [Edgar_1 2004]

¹⁰⁹ [Dewey 2007]

Die Variable d steht für die *Kimura - Distanz*. W_1 und w_2 ergeben sich aus den Häufigkeiten der Transition (P) - sowie der Transversion (Q) - Substitutionen.¹¹¹

An dieser Stelle erfolgt erneut die Berechnung des MSAs unter Verwendung des zweiten Baumes.^{112, 113} Im Weiteren erfolgt eine Maximierung des *sum - of - pairs - Scores (SPS)*. Dieser definiert das Matching von positionsspezifischen Nukleotiden in Abhängigkeit der *Gaps* für ein Multiples - Sequenz - Alignment und ergibt sich aus der Summe der *Matchings* für das MSA sowie des paarweisen Alignments.¹¹⁴ Für die Maximierung wird eine Kante des zweiten *UPGMA* - Baums entfernt, wodurch zwei Subbäume entstehen. Für diese erfolgt erneut die Berechnung eines progressiven Alignments, wenn sich der *sum - of - pairs - Scores* verbessert. Dieser Schritt erfolgt solange wie eine Maximierung des *SPS* möglich ist. Andernfalls werden die neu berechneten Bäume sowie die dazugehörigen *MSAs* verworfen.^{112, 113, 115} In der folgenden Abbildung wird der *Muscle* - Algorithmus zusammengefasst:

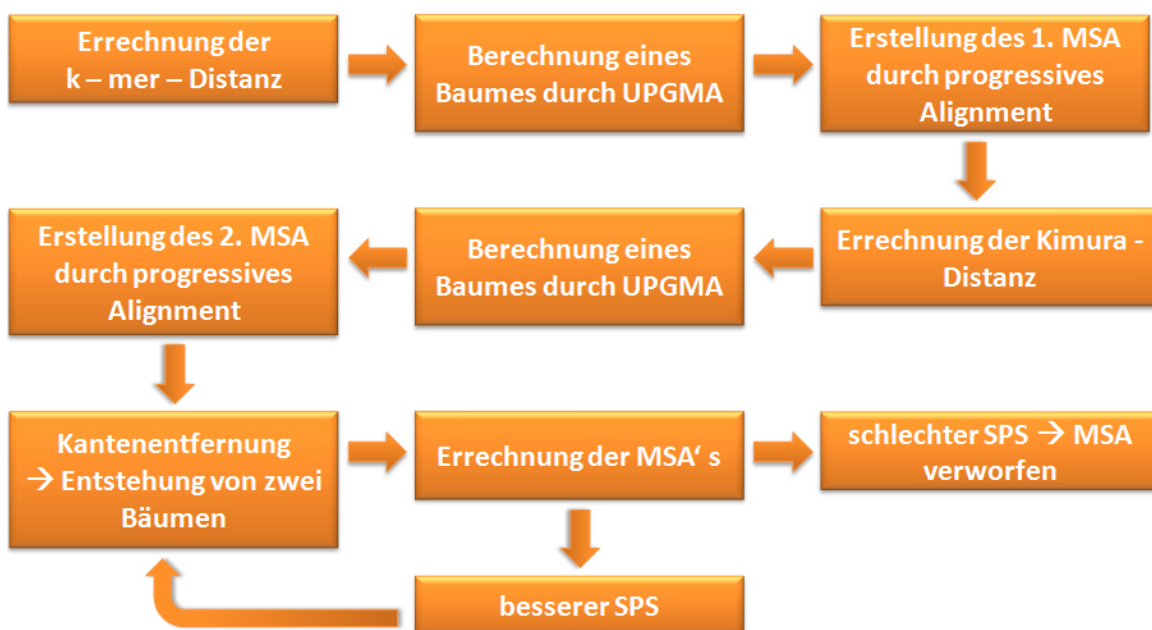


Abbildung 7 - 4.2 schematische Darstellung des *Muscle* - Algorithmus

Dargestellt ist eine vereinfachte Abfolge des *Muscle* - Algorithmus, welcher für die Erstellung eines multiplen Sequenz - Alignments verwendet wurde.

¹¹¹ [URL 47] ¹¹³ [Olijar 2013] ¹¹⁵ [Dewey 2007]

¹¹² [Edgar_1 2004] ¹¹⁴ [URL 46]

Kapitel 4.3 Der *UPGMA* - Algorithmus

Der *UPGMA* - Algorithmus (*Unweighted pair group method with arithmetic mean*)¹¹⁶ ist ein hierarchisches distanzbasierendes Verfahren durch die Verwendung von Distanzmatrizen zur Konstruktion eines ultrametrischen Baumes. Eine Ultrametrik (d) ist eine Metrik die durch folgende Axiome definiert ist:

$$d(a, b) \geq 0 \quad (6)$$

$$d(a, b) = 0 \Leftrightarrow a = b \quad (7)$$

$$d(a, b) = d(b, a) \quad (8)$$

$$d(a, c) \leq \max(d(a, b) + d(b, c)) \quad (9)$$

Neben der positiven Definitheit (6) und Symmetrie (8) muss die Ultrametrik die verschärfte Dreiecksungleichung (9) erfüllen. Dies bedeutet bezüglich der Distanzmatrix, dass eine Matrix mit ihrer Anzahl an Spalten und Zeilen ultrametrisch ist, wenn für beliebige Zeilen der Matrix gilt, dass das Maximum von $d(a, b)$, $d(a, c)$ und $d(b, c)$ genau zweimal vorkommt.^{117, 118} Eine Distanzmatrix besitzt einen ultrametrischen Baum, wenn die Matrix selbst ultrametrisch ist. *UPGMA* kann jedoch auch einen Baum generieren, dessen Distanzmatrix die verschärfte Dreiecksungleichung nicht erfüllt.¹¹⁸

Zu Generierung des Baumes werden zu Beginn die beiden ähnlichsten operativen taxonomischen Einheiten (OTU) durch die geringste Distanz innerhalb der Distanzmatrix gesucht und als Knotenpunkt zusammengefasst. Die OTUs repräsentieren die Schimmelpilze sowie deren Marker in dieser Masterarbeit. Anschließend erfolgt eine Neuberechnung der Distanzmatrix und ein iteratives Fortfahren dieser Methode. Die Distanz zwischen zwei Clustern berechnet sich aus den Mittelwerten der paarweisen Distanzmatrix.¹¹⁹ Problematisch an *UPGMA* ist, dass ein binärer Baum erzwungen wird unabhängig zum biologisch evolutionären Kontext.¹¹⁸

Kapitel 4.4 Der *Neighbor - Joining* - Algorithmus

Der hierarchische Algorithmus *Neighbor - Joining* (*NJ*)¹²⁰ nutzt nicht wie *UPGMA* eine ultrametrische Matrix sondern additive Matrizen. Additive Matrizen werden durch eine symmetrische Matrix definiert, dessen Distanzen positiv definit sind. Es wird angemerkt, dass eine ultrametrische Matrix auch einen additiven Baum induzieren kann, aber von

¹¹⁶ [Sokal 1958]

¹¹⁸ [Leser 2005]

¹²⁰ [Saitou 1987]

¹¹⁷ [Merkel 2009]

¹¹⁹ [URL 48]

einem additiven Baum nicht auf eine ultrametrische Matrix zurückgeführt werden kann.

¹²¹

Zu Beginn erfolgt eine Summierung der Distanzen (d) einer OTU bezüglich der übrigen OTUs (r). Anschließend erfolgt die Berechnung einer weiteren Distanzmatrix (M):

$$M(ij) = d(ij) - \frac{[r(i)+r(j)]}{N-2} \quad (10)$$

Die Variable N entspricht dabei der Anzahl aller OTUs.¹²² Für die Konstruktion des Baumes werden Kanten und Knoten, die den Baum abbilden, initialisiert. Der Algorithmus geht zum Zeitpunkt der Initialisierung von einem sternförmigen Initialbaum ohne Clustering aus. Im Folgenden wird durch sukzessives Clustering der OTUs die Gesamtlängen aller Äste durch die Distanzen minimiert. Für jeden weiteren Schritt werden die Gesamtlängen unter der Betrachtung verschiedener Clusterings erneut berechnet.^{121, 123} Es wird von einem Cluster die Distanz zu allen anderen Clustern ermittelt. Dies bedeutet, dass zwei Knoten mit dem geringsten Abstand zueinander als ein neuer Knoten zusammengefasst werden. Dies ist ein iteratives Vorgehen und erfolgt solange bis nicht mehr als ein Cluster vorhanden ist.¹²³

Das Wurzeln des *NJ* - Baums erfolgt unter Einbeziehung der *Outgroup*. Eine *Outgroup* ist ein Taxa, welches von allen anderen Taxa des Baumes am entferntesten ist. *Neighbor - Joining* nimmt daher an, dass die Kante, welche zur *Outgroup* führt, den Wurzelknoten beinhalten muss.¹²¹

Kapitel 4.5 Das *Bootstrap* - Verfahren

Zur Validierung phylogenetischer Bäume wurde als statistische *resampling* Methode das *Bootstrap* - Verfahren¹²⁴ verwendet. Dieses Verfahren nutzt das zuvor berechnete Multiple - Sequenz - Alignment. Ziel ist es zu prüfen, ob die Topologie des Baumes abhängig von wenigen Positionen des MSAs ist. Zu Beginn wird aus dem originalen MSA ein phylogenetischer Baum konstruiert. Dies wurde durch *UPGMA* bzw. *Neighbor - Joining* realisiert. Anschließend erfolgt eine *Resampling* des MSA. Dieser Schritt wird in der Literatur mit 500 bis 2500 Wiederholungen beschrieben.^{123, 125} Bei dem *Resampling* wird nun ein neues MSA berechnet, welches aus zufällig veränderten Positionen innerhalb der Sequenzen besteht. Unter Verwendung dieses neu konstruierten MSAs

¹²¹ [Leser 2005]

¹²³ [Merkel 2009]

¹²⁵ [Baum 2007]

¹²² [URL 49]

¹²⁴ [Felsenstein 1985]

wird der zuvor genutzte Clusteralgorithmus für die Berechnung eines neuen Baums genutzt. Anschließend erfolgt ein Vergleich der Topologie sowie der Wichtung beider Bäume. Dies führt zu einer Erhöhung der Wichtung (bezüglich der Kanten) um eine Einheit, wenn eine Übereinstimmung zwischen den beiden Bäumen gefunden wurde. Abschließend erfolgt eine Ermittlung des prozentualen *Bootstrap* - Wertes (Bt - Wert) aller Kanten, für die eine Erhöhung der Kantenwichtung erfolgte. Dafür wird die Anzahl der Iterationen für das *Resampling* durch die erhöhte Wichtung der Kanten dividiert. Kanten, die einen Prozentwert von ≥ 95 % besitzen, werden als korrekt angesehen. Ein niedriger *Bootstrap* - Wert bedeutet zwangsläufig nicht, dass Gruppierungen durch die Clusterverfahren falsch sind, sondern dass die vorliegenden Daten nicht ausreichend unterstützt werden und andere Algorithmen für einen Vergleich genutzt werden sollten.^{126, 127} Die *Bootstrap* - Werte werden in *MEGA 6* als *node statistics* beschrieben.¹²⁸

Kapitel 4.6 Das Programm *MEGA 6* und dessen Maskenoptionen

MEGA 6 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0*) ist ein bioinformatisches Tool, welches speziell für die Analyse phylogenetischer Untersuchungen konzipiert wurde.¹²⁹ Dieses Programm wurde für den Großteil der phylogenetischen Analysen durch eine realisierte *GUI* (graphical user interface) genutzt. Zu Beginn wurde durch *MEGA 6* ein Multiples - Sequenz - Alignment durchgeführt. Hierfür wurden die Algorithmen *ClustalW* und *Muscle* genutzt. Eine spezielle Funktion, die von *MEGA 6* angeboten wird, ist die Generierung eines MSA auf Codon basierenden Analysen sowohl für *Muscle* als auch *ClustalW*.

Als Datengrundlage für die MSAs wurden die *Fasta* - Files des Datensatzes aus Kapitel 3.2 verwendet. Für die Erstellung des MSA wurde der Algorithmus mit entsprechenden Parametern ausgewählt. *MEGA 6* ermöglichte eine Optimierung des *ClustalW* - Algorithmus für die *Gap - Cost - Models*, der DNA - Substitutions - Matrix, der Transition - Wichtung sowie des *Delay - Divergent - Cutoff - Score* und der Berücksichtigung von vorhandenen *Gaps* innerhalb der nicht alignierten Sequenzen.

¹²⁶ [Merkl 2009]

¹²⁸ [URL 50]

¹²⁷ [Baum 2007]

¹²⁹ [Tamura 2013]

Abbildung 8 - 4.6 Maske MEGA 6 für ClustalW

Die Abbildung zeigt die Maske vor Beginn der Ausführung des MSA unter Verwendung von *ClustalW*. Die hier dargestellten Parameter wurden je nach betrachteten Ansatz optimiert.

Das *Gap - Cost - Model* beeinflusst die Einführung sowie die Erweiterung von Lücken und damit die Qualität in einem Alignment. Eine Optimierung dieses Modells ist für ein paarweises und für ein multiples Sequenz - Alignment möglich. Als *DNA Weight Matrix* wurde für alle Ansätze die *IUB* ausgewählt. In der *IUB* werden alle Maches mit einem Score von 1,9 und Mismatches mit einem Score von 0,0 bewertet. Substitutionen sind in DNA - Matrizen kategorisch ausgeschlossen, werden aber durch die Transition - bzw. Transversion - Wichtung berücksichtigt. Das Zeichen für ein beliebiges Nukleotid "N" wird identisch zu den anderen Nukleotidbezeichnungen A, C, T, G gehandelt.¹³⁰ Der *Transition - Weight - Score* gibt eine zusätzliche Wichtung der Substitutionen von Pyrimidine und Purine an. Der Wert wird zwischen 0,0 und 1,0 definiert. Ein Wert von 0,0 bedeutet, dass Basengruppen im Alignment als Mismatch gewertet werden. Durch einen Wert von 1,0 wird dies als Matching gewertet. Biologisch entfernte DNA - Sequenzen

¹³⁰ [URL 36]

sollten daher bei einem Wert zwischen 0,0 und 0,5 und näher verwandte Sequenzen zwischen 0,5 und 1,0 definiert sein.¹³¹ Der *Delay - Divergent - Cutoff - Score* verzögert die Alignierung zwischen Sequenzen, welche auf Grund geringer Identität weit voneinander entfernt sind und aligniert diese erst, wenn nähere verwandte Sequenzen zuvor miteinander verglichen wurden. Der Score definiert hierbei einen prozentualen Identitätswert.¹³¹

Die Maskeneinstellungen für *Muscle* sind ebenfalls durch *MEGA 6* realisiert. Dazu zählen *Gap - Cost - Models* sowie die Unterstützung von Clusteralgorithmen bei der Ausführung des Multiplen - Sequenz - Alignments.

| Option | Selection |
|--------------------------------------|--|
| <input type="checkbox"/> Presets | None |
| Gap Penalties | |
| Gap Open | -400 |
| Gap Extend | 0 |
| Hydrophobicity Multiplier | Not Applicable |
| Memory/Iterations | |
| Max Memory in MB | 4095 |
| Max Iterations | 8 |
| More Advanced Options | |
| Clustering Method (Iteration 1,2) | UPGMB |
| Clustering Method (Other Iterations) | UPGMB |
| Min Diag Length (lambda) | 24 |
| Alignment Info | MUSCLE Citation: Edgar, Robert C. (2004), MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput, Nucleic Acids Research 32(5), 1792-1797. |

Abbildung 9 - 4.6 Maske *MEGA 6* für *Muscle*

Dargestellt ist die Maskenoberfläche für *Muscle* vor dem Beginn des MSA. Wie bei der *ClustalW* - Maske können auch hier *Gap - Cost - Models* variiert werden. Des Weiteren sind Clusterverfahren für das progressive Alignment auswählbar.

Bei dem speziellen Alignieren durch Berücksichtigung der Codons ist eine zusätzliche Optimierung von probabilistischen Modellen bezüglich der *Gap - Cost - Models* für die Eigenschaften von Aminosäuren, hinsichtlich ihrer *Residuen* und Hydrophilie möglich. Hinzu kommt die Unterscheidung von Substitutions - Matrizen zwischen Aminosäuren und Nukleotiden. Entscheidend ist des Weiteren die spezifische Einstellung des

¹³¹ [URL 37]

genetischen Codes, welcher sich im Vergleich von Schimmelpilzen und beispielsweise des Menschen unterscheidet.

Abbildung 10 - 4.6 Maske MEGA 6 für ClustalW Codon

Die Abbildung repräsentiert die möglichen Parameter, welche für ein MSA unter der Berücksichtigung der Codons zu optimieren sind. Es zeigt sich, dass bei dieser Wahl des Alignments die Eigenschaften der Aminosäuren zusätzlich berücksichtigt werden (Vergleich Abbildung 8 - 4.6).

Anders als bei *ClustalW* für DNA - Sequenzen wird bei *ClustalW* Codon die *Blosum* als *Weight - Matrix* an Stelle der IUB genutzt, da die Codons in Aminosäuren übersetzt werden. Nicht nachvollziehbar ist, welche *Blosum* Mega 6 verwendet. Die Einführung spezifischer *Gap* - Kosten für Residuen an jeder Position sollen die Qualität des Alignments erhöhen. Dazu zählt auch die zusätzliche Unterscheidung von hydrophoben bzw. hydrophilen Aminosäuren.¹³² Eine wesentliche Optimierung der Parameter für *ClustalW* Condon aber auch *Muscle* Codon ist die Auswahl des genetischen Codes für Schimmelpilze. Der elementare Unterschied ist, dass bei Schimmelpilzen das Codon

¹³² [URL 38]

TGA für Tryptophan codierend ist. Beim Menschen wird ein *TGA* als Stopcodon definiert.¹³³

Die generierten Multiplen - Sequenz - Alignments wurden anschließend in einem speziellen MEGA 6 - Format hinterlegt. Das Format wird als *Datei.mas* bezeichnet. Diese generierten MSAs wurden anschließend für die Erstellung der phylogenetischen Bäume unter Verwendung der Algorithmen *Neighbor - Joining* und *UPGMA* genutzt. Vor der Auswahl der beiden Algorithmen bietet *MEGA 6* eine spezielle Einbeziehung von Informationen an, ob das vorliegende MSA aus kodierenden bzw. nicht kodierenden DNA - Sequenzen besteht. Dadurch wird zusätzlich versucht, ein Clustering bezüglich des *open reading frame* sowie der Transkriptionsstartposition zu ermöglichen. Nach Auswahl des Clusteralgorithmus bietet *MEGA 6* weitere Parameter für die Optimierung der zu berechnenden Bäume an. Dazu gehören phylogenetische Signifikanz - Tests durch den *Bootstrap* - Algorithmus, die zusätzliche Betrachtung stochastischer Modelle, die Berücksichtigung evolutionärer Distanzen sowie verschiedene Verfahrensweisen für die *Gaps* innerhalb des Multiplen - Sequenz -Alignments.

¹³³ [URL 39]

| Option | Selection |
|-------------------------------|--------------------------------|
| Analysis | Phylogeny Reconstruction |
| Scope | All Selected Taxa |
| Statistical Method | Neighbor-joining |
| Phylogeny Test | |
| Test of Phylogeny | Bootstrap method |
| No. of Bootstrap Replications | 2000 |
| Substitution Model | |
| Substitutions Type | Nucleotide |
| Model/Method | Maximum Composite Likelihood |
| Substitutions to Include | d: Transitions + Transversions |
| Rates and Patterns | |
| Rates among Sites | Uniform rates |
| Gamma Parameter | Not Applicable |
| Pattern among Lineages | Same (Homogeneous) |
| Data Subset to Use | |
| Gaps/Missing Data Treatment | Pairwise deletion |
| Site Coverage Cutoff (%) | Not Applicable |

Buttons: ? Help, Compute, X Cancel

Abbildung 11 - 4.6 Maske MEGA 6 für Neighbor - Joining und nicht kodierender DNA

Die Abbildung repräsentiert die Maskenoberfläche für *Neighbor - Joining* ohne die Auswahl für kodierende DNA - Sequenzen des zuvor berechneten des Multiplen - Sequenz -Alignments. Diese Maske steht analog zu der von *UPGMA*.

Für die Optimierung zur Berechnung des phylogenetischen Baumes können zusätzliche Substitutionsmodelle hinzugefügt werden, wodurch evolutionäre Distanzen zwischen den Sequenzen bestimmt werden können. Dies wird bemessen an der Anzahl der substituierten Nukleotiden. Evolutionäre Distanzen sind elementar für die Rekonstruktion eines phylogenetischen Baumes.¹³⁴ Die Berechnung von Distanzen zwischen Sequenzen erfolgt in der Regel durch ein stochastisches Model. In dieser Arbeit wurde sich für das Standardmodel der Methode des *Maximum Composite Likelihood* entschieden. Diese Methode wird durch ihre Summe der *log - likelihoods* definiert, was bedeutet, wenn alle paarweisen Distanzen in einer Distanzmatrix korrelieren, dass auf phylogenetische Beziehungen der Sequenzen zurückgeschlossen werden kann.^{135, 136} Des Weiteren wird zur Berechnung der Bäume der Transition - / Transversion - Anteil berücksichtigt. Transversion beschreibt die Substitution von Purin mit Pyrimidinen sowie

¹³⁴ [URL 40] ¹³⁵ [Tamura 2004]

¹³⁶ [URL 41]

Pyrimidinen mit Purin. Unter Transition wird die Substitution von Adenin mit Guanin und Thymin mit Cytosin bezeichnet.¹³⁷ Hierfür wird der Anteil für jedes Nukleotid berechnet. Beträgt der Anteil eine Wahrscheinlichkeit von 0,5, gibt es keinen signifikanten Einfluss der Substitutionen. In diesem Fall wird Transition und Transversion als gleich wahrscheinlich angesehen. Die Berechnung des Transition - / Transversion - Anteil ist daher mit ausschlaggebend für die Bewertung der Distanzmatrizen durch die *Maximum Composite Likelihood* - Methode.^{138, 139} Durch die Option *Gaps / Missing Data Treatment* können die *Gaps* der enthaltenen Alignments entfernt werden (*Complete - deletion*) und somit fehlende Informationen für die spätere Berechnung der Bäume berücksichtigt werden. Alternativ kann aber auch die Information eines Gaps berücksichtigt werden (*Pairwise - deletion*).¹³⁹

Im Folgenden wird die Maske für die Berechnung der phylogenetischen Bäume unter der Betrachtung für proteinkodierender DNA - Sequenzen vorgestellt:

¹³⁷ [SAV 2009] ¹³⁹ [URL 42]

¹³⁸ [URL 40]

The screenshot shows the 'Options Summary' dialog box in MEGA 6. It contains a table with two columns: 'Option' and 'Selection'. The options are grouped into sections: Analysis, Phylogeny Test, Substitution Model, Rates and Patterns, and Data Subset to Use. The 'Select Codon Positions' section at the bottom has four checked checkboxes: 1st, 2nd, 3rd, and Noncoding Sites. At the bottom of the dialog are buttons for 'Help', 'Compute', and 'Cancel'.

| Option | Selection |
|-------------------------------------|---|
| Analysis | Phylogeny Reconstruction |
| Scope | All Selected Taxa |
| Statistical Method | Neighbor-joining |
| Phylogeny Test | |
| Test of Phylogeny | Bootstrap method |
| No. of Bootstrap Replications | 2000 |
| Substitution Model | |
| Substitutions Type | Nucleotide |
| Genetic Code Table | Not Applicable |
| Model/Method | Tamura 3-parameter model |
| Fixed Transition/Transversion Ratio | Not Applicable |
| Substitutions to Include | d: Transitions + Transversions |
| Rates and Patterns | |
| Rates among Sites | Uniform rates |
| Gamma Parameter | Not Applicable |
| Pattern among Lineages | Same (Homogeneous) |
| Data Subset to Use | |
| Gaps/Missing Data Treatment | Pairwise deletion |
| Site Coverage Cutoff (%) | Not Applicable |
| Select Codon Positions | <input checked="" type="checkbox"/> 1st <input checked="" type="checkbox"/> 2nd <input checked="" type="checkbox"/> 3rd <input checked="" type="checkbox"/> Noncoding Sites |

Abbildung 12 - 4.6 Maske MEGA 6 für Neighbor - Joining für kodierende DNA

Im Vergleich zu Abbildung 11 - 4.6 bietet die Maske für die Berechnung der phylogenetischer Bäume unter der Berücksichtigung kodierender DNA - Sequenzen nur eine zusätzliche Funktion: *Select Codon Position*.

Die hier dargestellte Maske für den Neighbor - Joining - Algorithmus besitzt dieselben Einstellungen bezüglich der Maske des UPGMA - Algorithmus.

Die Einstellung *Select Codon Position* dient hierbei einem weiteren vorgezogenen Clustering des erzeugten Multiplen - Sequenz - Alignments unter Berücksichtigung der ersten drei Codons bzw. nicht codierender Abschnitte.¹⁴⁰

Die abschließenden berechneten Bäume ermöglichen verschiedene Darstellungsformen von standardgemäß rechtwinkligen bis zirkulären Bäumen. Des Weiteren ist eine Ausgabe von Distanzen sowie Konten - Statistiken für den phylogenetischen Baum und dem Bootstrap - Baum vorhanden. Die Bäume wurden für Auswertungszwecke als *pdf - Datei* und für weiterführende Analysen als Newick - Format durch MEGA 6 hinterlegt.

¹⁴⁰ [URL 42]

Kapitel 4.7 Consensus Maker

Der *Consensus Maker* wurde für die Ermittlung der Konsensussequenz aus einem vorher erfolgten Multiplen - Sequenz - Alignment unter Verwendung von *ClustalW* durchgeführt. Das Programm *Consensus Maker* ist ein Online - Tool der *HIV sequence database*.^{141, 142} Das Programm bietet drei verschiedene Verfahren zu Ermittlung von Konsensussequenz an. Diese sind das *Simple* -, das *Advanced* - sowie das *Ambiguity* - Verfahren. Für die Analyse wurde das *Advanced* - Verfahren gewählt, um eine größere Parameteroptimierung zu gewährleisten. Das zuvor generierte MSA wurde als *Pyhlip* - Format hinterlegt, um durch *Consensus Maker* die Konsensussequenz zu ermitteln.

The screenshot displays the configuration options for the *Consensus Maker* tool. The options are as follows:

- Squeeze gaps in input:** Yes ☐ No ☒
- Gap character:** -
- Do consensus for each block:** Yes ☐ No ☒
- Minimum number of sequences for consensus:** 3
- Make a consensus of consensus:** Yes ☐ No ☒
- Show both, consensus + alignment:** Yes ☒ No ☐
- Show number of sequences in consensus:** Yes ☐ No ☒
- Output format:** Pretty ☒ Output aligned ☐ Like input ☐
- Unanimous value:** 1.00
- Majority value:** 0.50
- Use most common character:** Yes ☒ No ☐
- Break ties with:** IUPAC characters ☐ Letters in whole column ☒
- Character set for making the consensus:**
 - nucleotides: AGCTU-
 - amino acids: ARNDCEQGHILKMFPSTYWV-
- ☐ Or check here to use any (all) characters

Abbildung 13 - 4.7 Maske *Consensus Maker*¹⁴³

Dargestellt sind die Parameter, welche zur Erstellung einer Konsensussequenz für das *Advanced* - Verfahren berücksichtigt wurden.

Es musste für die Ermittlung der Konsensussequenz bedacht werden, dass die *Gaps* aus dem zuvor erstellten MSA mit berücksichtigt werden. Die Option *Do consensus for each block* bezieht sich auf das zu Grunde liegende *Pyhlip* - Format, welches in multiplen Sequenzblöcken aufgebaut ist. Des Weiteren musste eine Anzahl an Sequenzen definiert werden, wodurch die Anzahl an Häufigkeiten eines Nukleotids beschrieben wird. Dieser Wert variiert wie später im Kapitel 5 beschrieben. Die Optionen

¹⁴¹ [URL 43] ¹⁴³ [URL 44]

¹⁴² URL: <http://www.hiv.lanl.gov/content/index>

Show both, consensus + alignment, *Show number of sequences in consensus* sowie *Output format* waren für eine sinnvolle Repräsentation der Konsensussequenz von Interesse.¹⁴⁴ Es wurde daher für die späteren *Outputs* auf eine erneute Darstellung des MSAs verzichtet. Der *Unanimous value* definiert die Anzahl der unterschiedlichen Nukleotide für jede Position im MSA und gibt durch seinen *Score* die benötigte Übereinstimmung der Nukleotide an, um ein Konsensusprofil zu ermitteln. Als weiterer wichtiger Parameter ist der *Majority value* zu benennen. Dieser ist aufbauend bezüglich des *Unanimous value* und definiert, dass auf einer Positionen verschiedene Nukleotide enthalten sein können, wodurch ein gewisser Prozentsatz der Nukleotide vertreten sein muss, damit an dieser Stelle ein Konsensusprofil ermittelt werden kann.¹⁴⁵

Kapitel 4.8 Der Konsensusbaum

Für die Generierung eines Konsensusbaums wurde das Programm *consense* aus der Programmsammlung *Phylip* Version 3.69 verwendet.¹⁴⁶ Die Programmsammlung *Phylip* ist speziell für phylogenetische Untersuchungen von DNA / RNA und Proteinen geeignet.¹⁴⁷ Für die Verwendung des Programmes *consense* werden phylogenetische Bäume im *Newick* - Format verwendet. Des Weiteren ist eine einheitliche Bezeichnung der OTUs sowie eine gleiche Gesamtanzahl an OTUs für jeden phylogenetischen Baum vorgeschrieben. Für die Berechnung eines Konsensusbaums wird die *Majority* - Regel verwendet, welche eine häufigkeitsbasierende Methode bezüglich der phylogenetischen Gruppen darstellt. Hierfür werden Gruppen betrachtet, die in mindestens 50% der phylogenetischen Bäume auftreten.^{146, 148} In der folgenden Abbildung wird die Konstruktion eines Konsensusbaums beschrieben.

¹⁴⁴ [URL 44] ¹⁴⁶ [URL 51] ¹⁴⁸ [Will 2008]

¹⁴⁵ [URL 45] ¹⁴⁷ [URL 52]

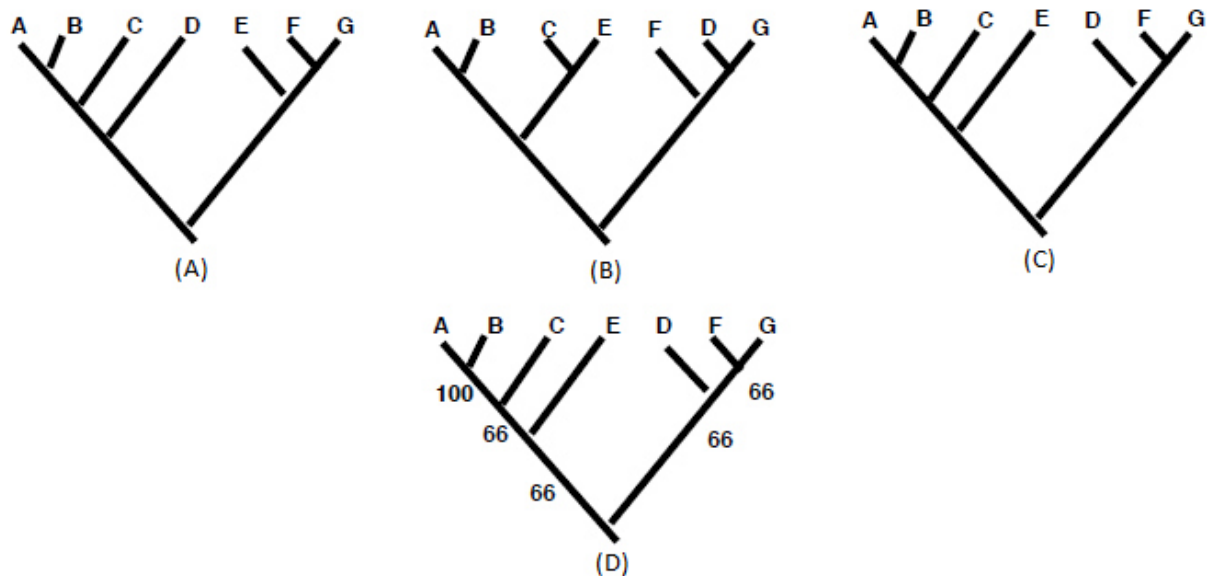


Abbildung 14 - 4.8 Konstruktion des Konsensusbaums¹⁴⁸

Diese Abbildung zeigt wie ein Konsensusbaums unter Verwendung der *Majority* - Regel konstruiert wird. Es ist zu erkennen, dass in drei Bäumen (A), (B) und (C) dieselbe Gruppen durch die OTUs A und B gebildet wurden. Diese Gruppierungen entsprechen damit einer Übereinstimmung von 100% und werden daher in dem Konsensusbaum (D) analog übernommen. Die OTUs F und G sind in Baum (A) und Baum (C) miteinander gruppiert, was jedoch nicht für Baum (B) gilt. Da sich hier aber eine Häufigkeit dieser Gruppierung über 50 % ergibt (genau 66 %), wird diese Gruppierung für den Konsensusbaum hinzugefügt. Dieses Prinzip der Häufigkeitenbetrachtung setzt sich im weiteren Verlauf für die Konstruktion des Konsensusbaums fort.¹⁴⁸

Bis zu dieser Stelle wurden in der Masterarbeit die Schimmelpilze, Marker und bioinformatische Grundlagen beschrieben. Im anschließenden Kapitel werden die unterschiedlichen Ansätze für die phylogenetische Analyse der Schimmelpilze vorgestellt.

¹⁴⁸ [Hankeln 2010]

Kapitel 5 Ansätze zur phylogenetischen Bestimmung von Schimmelpilzen

Dieses Kapitel beschreibt die Vorgehensweise der phylogenetischen Analyse bezüglich der Schimmelpilze und die dafür verwendeten Ansätze. Die Ansätze unterscheiden sich in der Verwendung der bioinformatischen Tools und Algorithmen, den gewählten Parametern sowie in der Auswahl der genetischen Marker und Schimmelpilze.

Kapitel 5.1 Phylogenetische Bestimmung durch Konsensussequenzen

Ansatz 1: Phylogenetische Bestimmung unter Verwendung von vier Markern

Für diesen Ansatz wurden zu Beginn die Schimmelpilze ausgewählt, für welche die meisten sequenziellen Marker gefunden wurden. Im Folgenden werden die genutzten Schimmelpilze und Marker beschrieben:

Tabelle 4 - 5.1 Auswahl der Schimmelpilze

Dargestellt sind die Schimmelpilze, welche für Generierung von Konsensussequenzen verwendet wurden, um möglichst eine Vielzahl an Markern zu berücksichtigen.

| | | |
|-----------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|
| <i>Alternaria alternata</i> | <i>Aspergillus versicolor</i> | <i>Fusarium oxysporum</i> |
| <i>Alternaria tenuissima</i> | <i>Aspergillus vitis</i> | <i>Fusarium solani</i> |
| <i>Aspergillus glaucus</i> | <i>Aureobasidium pullulans</i> | <i>Penicillium chrysogenum</i> |
| <i>Aspergillus niger</i> | <i>Cladosporium cladosporioides</i> | <i>Trichoderma harzianum</i> |
| <i>Aspergillus penicillioides</i> | <i>Cladosporium herbarum</i> | <i>Trichoderma viride</i> |

Die ausgewählten Marker für diesen Ansatz waren *ITS1*, *ITS2*, *TUB2*, und *RPB2*.

Da ein Marker mehrere DNA - Sequenzen für einen Schimmelpilz in dem *Fasta - File* beinhaltet, wurde marker - bzw. pilzspezifisch ein Multiples - Sequenz - Alignment unter

der Verwendung von *ClustalW* (siehe Kapitel 4.1) erstellt. Hierfür wurde aber nicht MEGA 6, sondern *ClustalW* des *European Bioinformatics Institute (EBI)* verwendet.^{149, 150} Grund hierfür war eine optimale *Output* - Funktion des MSAs für die Konvertierung in das *Phylip* - Format. Des Weiteren erfolgte ein *Output* - File für die berechneten *Scores* der alignierten Sequenzen. Die verwendeten Parameter von *ClustalW* werden in folgender Tabelle beschrieben:

Tabelle 5 - 5.1 Parameter *ClustalW* (EBI)

Es werden die verschiedenen Parameter sowie die dazugehörigen Werte und Einstellungen für die Berechnung eines MSAs unter Verwendung von *ClustalW* auf dem *EBI* beschrieben.

| | | |
|---|--------------------------|---------------------------|
| <i>Pairwise Alignment</i> | <i>DNA Weight Matrix</i> | <i>IUB</i> |
| | <i>Gap Open</i> | 10 |
| | <i>Gap Extension</i> | 2,5 |
| <i>Multiple Sequence Alignment</i> | <i>DNA Weight Matrix</i> | <i>IUB</i> |
| | <i>Gap Open</i> | 10 |
| | <i>Gap Extension</i> | 2,5 |
| | <i>Gap Distance</i> | 5 |
| | <i>Clustering</i> | <i>Neighbor - Joining</i> |
| <i>Output Option</i> | <i>Format</i> | Phylip |

Die Wahl des *Gap - Cost - Models* lässt sich dadurch begründen, dass die zu alignierenden Sequenzen aus biologischer Sicht eine nahe Verwandtschaft aufweisen und aus sequenzieller Sicht eine ähnliche Länge besitzen. Daher wurde ein hoher Wert für das Einfügen von *Gaps* gewählt. Die Wahl für geringere Kosten zur Erweiterung von *Gaps* lassen sich auf die geringen Längenunterschiede zurückführen.

Für die folgenden Schimmelpilze konnte zu bestimmten Markern kein Multiples - Sequenz - Alignment erstellt werden.

¹⁴⁹ [URL 51]

¹⁵⁰ URL: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>

Tabelle 6 - 5.1 Ausschluss von Schimmelpilzen (Ansatz 1)

Für diese Schimmelpilze wurde kein MSA erstellt.

| | | | | |
|--|-------------|-------------|-------------|-------------|
| <i>Aspergillus glaucus</i> | <i>ITS1</i> | <i>ITS2</i> | <i>TUB2</i> | <i>RPB2</i> |
| <i>Aspergillus niger</i> | | | | <i>RPB2</i> |
| <i>Cladosporium cladosporioides</i> | | | | <i>RPB2</i> |
| <i>Cladosporium herbarum</i> | | | <i>TUB2</i> | <i>RPB2</i> |
| <i>Trichoderma viride</i> | | | | <i>RPB2</i> |

Die Erstellung eines MSA war nicht möglich, da die Fasta - Files zu den gezeigten Markern nur eine DNA - Sequenz enthalten.

Für die Erstellung der Konsensussequenzen unter Verwendung der MSAs wurde anschließend das Programm *Consensus Maker* verwendet (siehe Kapitel 4.7). Folgende Parameter wurden optimiert:

Tabelle 7 - 5.1 Parameter für *Consensus Maker*

Zu erkennen sind die Parameter, welche für die Erstellung sowie für die Ausgabe der Konsensussequenzen gewählt wurden.

| | | |
|------------------------------------|--|----------------|
| <i>Consensus - Making - Option</i> | <i>Unanimous value</i> | 1,00 |
| | <i>Majority value</i> | 0,50 |
| | <i>Gaps in input</i> | Yes |
| <i>Output Option</i> | <i>Minimum number of sequences for consensus</i> | 2 -3* |
| | <i>Consensus of consensus</i> | No |
| | <i>consensus + alignment</i> | No |
| | <i>Output format</i> | Output aligned |

Die Wahl des *Majority value* sowie des *Unanimous value* fiel auf die Standardeinstellung. Des Weiteren mussten die *Gaps* der zuvor erstellten MSAs berücksichtigt werden. Der Wert für *Minimum number of sequences for consensus* variiert auf Grund der Sequenzanzahl im MSA. Wenn dieses nur zwei Sequenzen enthielt, musste dieser schlussfolgernd auf 2 definiert werden. Für MSAs, welche mehr als zwei Sequenzen enthielten, wurde der Wert auf 3 festgelegt.

Die schimmelpilzspezifischen Konsensussequenzen der unterschiedlichen Marker wurden anschließend markerspezifisch zusammen betrachtet. Im nächsten Schritt erfolgte die Erstellung eines weiteren Multiplen - Sequenz - Alignment durch *ClustalW* unter Verwendung von Mega 6. Da eine Genierung dieser MSAs auf Grund einer hohen Differenz der Sequenzlängen teilweise nicht möglich war, mussten diese *Gaps* zusätzlich entfernt werden. Dieses Problem entstand durch die Einführung von *Gaps* in den Konsensussequenzen. Des Weiteren wurden die zuvor ausgeschlossenen Schimmelpilze aus Tabelle 6 - 5.1 in diesem Schritt wieder betrachtet.

Tabelle 8 - 5.1 Parameter *ClustalW* 01 *Mega* 6

Diese Tabelle beschreibt, welche Parameter für das *Pairwise Alignment* sowie *Multiple - Sequence - Alignment* unter Verwendung von *ClustalW* des Programms Mega 6 definiert wurden.

| | | |
|---|-------------------------------|------------|
| <i>Pairwise Alignment</i> | <i>DNA Weight Matrix</i> | <i>IUB</i> |
| | <i>Gap Open</i> | 10 |
| | <i>Gap Extension</i> | 2,5 |
| <i>Multiple Sequence Alignment</i> | <i>DNA Weight Matrix</i> | <i>IUB</i> |
| | <i>Gap Open</i> | 10 |
| | <i>Gap Extension</i> | 2,5 |
| | <i>Transition Weight</i> | 0,5 |
| | <i>Delay Divergent Cutoff</i> | 30 % |

Die definierten *Gap - Cost - Models* werden denen der zuvor erstellten MSAs auf dem *EBI* gleichgesetzt. Als *DNA Weight Matrix* wurde standardgemäß die *IUB* gewählt. *Transition Weight* und *Delay Divergent Cutoff* wurden auf Grund der näheren Verwandtschaft bezüglich der Schimmelpilze bei 0,5 und 30% definiert.

Aus den erstellten MSAs wurden anschließend phylogenetische Bäume unter Verwendung des *Neighbor - Joining* - und *UPGMA* - Algorithmus berechnet (siehe Kapitel 4.3 und Kapitel 4.4).

Tabelle 9 - 5.1 Parametereinstellung für *Neighbor - Joining* und *UPGMA* unter *Mega 6*

Die Tabelle repräsentiert die Maskeneinstellung von *Mega 6* für die Berechnung der phylogenetische Bäume mittels *Neighbor - Joining* und *UPGMA*.

| <i>Neighbor-Joining / UPGMA</i> | <i>Test of Phylogeny</i> | <i>Bootstrap method</i> |
|---------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|
| | <i>No. of Bootstrap Replications</i> | 2000 |
| | <i>Substitution Typ</i> | <i>Nucleotide</i> |
| | <i>Model</i> | <i>Maximum Composite Likelihood</i> |
| | <i>Substitutions to Include</i> | <i>Transitions + Transversions</i> |
| | <i>Gap / Missing Data Treatment</i> | <i>Complete Deletion</i> |

Als phylogenetischer Signifikanztest wurde das *Bootstrap* - Verfahren mit 2000 *resamplings* gewählt. Zusätzlich wurden die Substitutionsmodelle *Maximum Composite Likelihood* sowie die *Transitions - und Transversions - Rate* berücksichtigt.

Die phylogenetischen Bäume sowie die *Bootstrap* - Konsensusbäume wurden als pdf - Datei zur Visualisierung und als *Newick* - Datei für die Generierung des Konsensusbaums hinterlegt. Die Konsensusbäume wurden durch das Programm *consense* der Programmsammlung *Phylip* generiert (siehe Kapitel 4.8). Dafür mussten die hinterlegten *Newick* - Dateien, welche im Einzelnen die phylogenetischen Bäume der bestimmten Markers enthielten, in eine gemeinsame *Newick* - Datei überführt werden. Es erfolgte eine separate Betrachtung der *NJ* - und *UPGMA* - Bäume zur Konstruktion der Konsensusbäume.

Tabelle 10 - 5.1 Parameter für *consense*

Im Folgenden werden die Parametereinstellungen für die Generierung der Konsensusbäume unter Verwendung des Programmes *consense* vorgestellt:

| <i>Consensus type</i> | <i>Majority rule (extended)</i> |
|--------------------------------------|---------------------------------|
| <i>Outgroup root</i> | No |
| <i>Trees to be treated as Rooted</i> | No |
| <i>Terminal type</i> | IBM PC |
| <i>Print out the sets of species</i> | No |
| <i>Print out tree</i> | Yes |
| <i>Write out tree</i> | Yes |

Für die Konstruktion der Konsensusbäume wurde die erweiterte *Majority rule* gewählt. Die erhaltene *outtree* - Datei wurde in das *Newick* - Format überführt, durch Mega 6 visualisiert und als pdf - Datei hinterlegt.

Ansatz 2: Phylogenetische Bestimmung unter Verwendung von fünf Markern

Dieser Ansatz ist methodisch identisch zu Ansatz 1 aufgebaut. Zusätzlich wird für diesen Ansatz der *TUB2* - Exon - Marker betrachtet. Dies führte dazu, dass die Schimmelpilze *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus versicolor* und *Cladosporium cladosporioides* entfielen, da eine Separierung der Exon - Region bei diesen Schimmelpilzen nicht möglich war (Vergleich mit Tabelle 3 - 3.2). Dieses Verfahren hatte den Vorteil, dass Konsensussequenzen aller *ITS* - Regionen verwendet werden konnten, da *Aspergillus glaucus* entfiel. Ein weiterer Vorteil war, dass für die Berechnung eines Konsensusbaums ein zusätzlicher Marker berücksichtigt wurde, wodurch ein größerer Einfluss auf die *Majority rule* entstand. Der Einfluss wirkt sich auf die statistische Grundlage für die zu berechnenden Häufigkeiten der Gruppierungen aus.

Kapitel 5.2 Phylogenetische Bestimmung der Schimmelpilze für ihrer Gattungen

Ansatz 3: Globale phylogenetische Bestimmung der Schimmelpilze (*ClustalW*)

Dieser Ansatz beschäftigte sich mit der phylogenetischen Untersuchung der Schimmelpilze (Vergleich der Gattungen) unter der Verwendung aller Marker. Hierfür wurden zu Beginn zwei verschiedene Multiple - Sequenz - Alignements verwendet. Anschließend wurden die einzelnen markerspezifischen *Fasta* - *Files* für alle Schimmelpilze zusammengefasst. Beide MSAs wurden durch *ClustalW* erzeugt, unterscheiden sich aber in ihrer Parametereinstellung. Im Folgenden werden die MSAs durch die Bezeichnung *ClustalW_01* und *ClustalW_02* differenziert.

Tabelle 11 - 5.2 Betrachte Schimmelpilze in Abhängigkeit der Marker (global)

Diese Tabelle zeigt, für welche Marker die Schimmelpilze betrachtet wurden, um eine gattungsübergreifende Differenzierung zu ermöglichen. Dabei zeigt sich, dass die Anzahl der Schimmelpilze in Abhängigkeit der Marker unterschiedlich ist, für welche eine phylogenetische Untersuchung durchgeführt wurde.

| Marker | Schimmelpilz |
|-------------------------|---|
| ITS1 / ITS2/ TUB2 | <i>Alternaria alternata</i> , <i>Alternaria tenuissima</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus penicillioides</i> , <i>Aspergillus glaucus</i> , <i>Aspergillus versicolor</i> , <i>Aspergillus vitis</i> , <i>Aureobasidium pullulans</i> , <i>Cladosporium cladosporioides</i> , <i>Cladosporium herbarum</i> , <i>Epicoccum nigrum</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Fusarium solani</i> , <i>Mucor mucedo</i> , <i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>Penicillium funiculosum</i> , <i>Trichoderma harzianum</i> , <i>Trichoderma viride</i> |
| TUB2 - Exon | <i>Alternaria alternata</i> , <i>Alternaria tenuissima</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus penicillioides</i> , <i>Aspergillus vitis</i> , <i>Aureobasidium pullulans</i> , <i>Cladosporium herbarum</i> , <i>Epicoccum nigrum</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Fusarium solani</i> , <i>Mucor mucedo</i> , <i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>Penicillium funiculosum</i> , <i>Trichoderma harzianum</i> , <i>Trichoderma viride</i> |
| RPB2 | <i>Alternaria alternata</i> , <i>Alternaria tenuissima</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus penicillioides</i> , <i>Aspergillus glaucus</i> , <i>Aspergillus versicolor</i> , <i>Aspergillus vitis</i> , <i>Aureobasidium pullulans</i> , <i>Cladosporium cladosporioides</i> , <i>Cladosporium herbarum</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Fusarium solani</i> , <i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>Trichoderma harzianum</i> , <i>Trichoderma viride</i> |
| TEF1 | <i>Alternaria alternata</i> , <i>Alternaria tenuissima</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Aureobasidium pullulans</i> , <i>Cladosporium cladosporioides</i> , <i>Cladosporium herbarum</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Fusarium solani</i> , <i>Trichoderma harzianum</i> , <i>Trichoderma viride</i> |
| TEF1 - Exon | <i>Aureobasidium pullulans</i> , <i>Cladosporium cladosporioides</i> , <i>Cladosporium herbarum</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Fusarium solani</i> , <i>Trichoderma harzianum</i> , <i>Trichoderma viride</i> |
| TOP2 | <i>Aspergillus niger</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Fusarium solani</i> , <i>Penicillium chrysogenum</i> , |
| ACT / ACT - Exon | <i>Cladosporium cladosporioides</i> , <i>Cladosporium herbarum</i> , <i>Epicoccum nigrum</i> , <i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>Trichoderma harzianum</i> , |

Für *ClustaW_01* gelten die gleichen Parameter wie in Tabelle 8 - 5.1 zu entnehmen ist. Für *ClustaW_02* erfolgte eine Änderung der *Gap - Cost - Models*. Ein Vergleich dieser

beiden Modelle soll Einflüsse auf die erstellten MSAs und der späteren phylogenetischen Bäume aufzeigen. Das *Gap - Cost - Models* für *ClustalW_02* wurde wie folgt definiert:

Tabelle 12 - 5.2 Parameter für *ClustalW_02* unter Verwendung von *Mega 6*

Im Folgenden sind die Lückenkosten für der Berechnung eines *Pairwise - Alignment* und eines *Multiple - Sequence - Alignment* bezüglich *ClustalW* unter Verwendung von *Mega 6* zu entnehmen.

| | | |
|------------------------------------|---------------|---|
| Pairwise Alignment | Gap Open | 4 |
| | Gap Extension | 2 |
| Multiple Sequence Alignment | Gap Open | 4 |
| | Gap Extension | 2 |

Die Parameter *DNA Weight Matrix*, *Transition Weight* und *Delay Divergent Cutoff* wurden wie bei *Clustalw_01* definiert. Anschließend erfolgte eine Berechnung der phylogenetischen Bäume für die MSAs von *ClustalW_01* und *ClustalW_02*. Die hierfür verwendeten Algorithmen waren *Neighbor - Joining* und *UPGMA*. Die Einstellungen gelten wie in Tabelle 9 - 5.1 beschrieben. Bei der Berechnung der Bäume entstand das Problem, dass für die Marker *TUB2*, *TUB2 - Exon*, *ITS2*, und *TEF1* keine Berechnung auf Grund des divergenten MSAs möglich war. Dies geschah durch zu gravierende Längenunterschiede zwischen den Sequenzen. Daher mussten die *Fasta - Files* der betreffenden Sequenzen überarbeitet werden.

Tabelle 13 - 5.2 Entfallene Schimmelpilze nach der Optimierung des Datensatzes

Die Tabelle beschreibt, für welche Marker die Schimmelpilze entfielen.

| MSA | Marker | Schimmelpilz |
|--------------------|--------------------|---|
| <i>ClustalW_01</i> | <i>TUB2</i> | <i>Trichoderma viride</i> |
| | <i>ITS2</i> | <i>Cladosporium herbarum</i> , <i>Aspergillus glaucus</i> , |
| | <i>TEF1</i> | <i>Alternaria tenuissima</i> , <i>Alternaria alternata</i> , <i>Aureobasidium pullulans</i> , <i>Aspergillus niger</i> |
| <i>ClustalW_02</i> | <i>TUB2</i> | <i>Trichoderma viride</i> |
| | <i>TUB2 - Exon</i> | <i>Penicillium funiculosum</i> |
| | <i>ITS2</i> | <i>Cladosporium herbarum</i> , <i>Aspergillus glaucus</i> , |
| | <i>TEF1</i> | <i>Alternaria alternata</i> , <i>Alternaria tenuissima</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Aureobasidium pullulans</i> |

Für *TUB2* konnte eine zusätzliche Separierung erreicht werden, um möglichst wenige Schimmelpilze auszuschließen. Hierfür wurde der *TUB2* - Datensatz in zwei Teildatensätze aufgeteilt. Dies geschah ausgehend von den Sequenzlängen. Das Kriterium erfolgte bei Teildatensatz 1 (*TUB2_klein*) für eine Sequenzlänge kleiner einhundert, demnach wurde Teildatensatz 2 (*TUB2_groß*) bei einer Sequenzlänge von größer einhundert Nukleotiden definiert.

Tabelle 14 - 5.2 Datensatzseparierung für *TUB2*

Es werden die Schimmelpilze aufgelistet, welche im Datensatz *TUB2_klein* sowie *TUB2_groß* enthalten sind. Die Unterteilung gilt für die späteren MSAs von *ClustalW_01* und *ClustalW_02*.

| | |
|-------------------|--|
| <i>TUB2_klein</i> | <i>Alternaria alternata, Alternaria tenuissima, Aureobasidium pullulans, Aspergillus versicolor, Aspergillus vitis, Cladosporium cladosporioides, Penicillium chrysogenum, Penicillium funiculosum, Fusarium oxysporum, Fusarium solani</i> |
| <i>TUB2_groß</i> | <i>Alternaria alternata, Alternaria tenuissima, Aspergillus niger, Aspergillus penicillioides, Aspergillus glaucus, Aspergillus versicolor, Aspergillus vitis, Aureobasidium pullulans, Cladosporium cladosporioides, Cladosporium herbarum, Fusarium oxysporum, Fusarium solani, Mucor mucedo, Penicillium chrysogenum, Trichoderma harzianum</i> |

Anschließend erfolgte das wiederholte Berechnen der MSAs für *ClustalW_01*, *ClustalW_02* und der daraus zu konstruierten phylogenetischen Bäume.

Ansatz 4: Globale phylogenetische Bestimmung der Schimmelpilze (*Muscle*)

Dieser Ansatz unterscheidet sich zu Ansatz 3 in dem Maße, dass ein alternativer Algorithmus zur Erstellung eines Multiplen - Sequenz - Alignments verwendet wurde. Es handelt sich dabei um den Algorithmus *Muscle*. Die hierfür verwendete Datengrundlage entspricht jener aus Ansatz 3 (siehe Tabelle 11 - 5.2.). Die Erstellung des MSAs erfolgte in zwei Vergleichsansätzen, welche sich in deren Parametern speziell den *Gap - Cost - Models* unterscheiden. Zur Differenzierung werden diese als *Muscle_01* und *Muscle_02* bezeichnet.

Tabelle 15 - 5.2 Parameter für *Muscle* unter Verwendung von *Mega 6*

Die Parametereinstellungen für *Muscle_01* sowie *Muscle02* sind in der Tabelle aufgeführt. Bei den Parametern handelt es sich um die *Gap - Cost* - Modelle und Wahl der Clusteralgorithmen.

| | | |
|------------------|--|---------------------------|
| <i>Muscle_01</i> | <i>Gap Open</i> | -400 |
| | <i>Gap Extension</i> | 0 |
| | <i>Clustering Mehtod (Iteration 1, 2)</i> | <i>Neighbor - Joining</i> |
| | <i>Clustering Mehtod (Other Iteration)</i> | <i>UPGMA</i> |
| <i>Muscle_02</i> | <i>Gap Open</i> | -100 |
| | <i>Gap Extension</i> | 0 |
| | <i>Clustering Mehtod (Iteration 1, 2)</i> | <i>Neighbor - Joining</i> |
| | <i>Clustering Mehtod (Other Iteration)</i> | <i>UPGMA</i> |

Anschließend erfolgte eine Berechnung der phylogenetischen Bäume, jeweils für *Muscle_01* sowie *Muscle_02* unter Verwendung von *Neighbor - Joining* und *UPGMA*. In diesem Ansatz trat ebenfalls das Problem auf, dass aus den verschiedenen MSAs teilweise keine phylogenetischen Bäume berechnet werden konnten. Hierfür wurde separat von Ansatz 3 der Datensatz optimiert, indem zu große bzw. zu kleine Sequenzen entfernt wurden. Der Schwellwert liegt bei einer durchschnittlichen Abweichung der Sequenzlänge von 30bp.

Tabelle 16 - 5.2 Entfallene Schimmelpilze nach der Optimierung des Datensatzes

Die Tabelle enthält alle Schimmelpilze, welche aus dem Datensatz entfernt werden mussten, um einen phylogenetischen Baum zu berechnen.

| MSA | Marker | Schimmelpilz |
|------------------|--------------------|--|
| <i>Muscle_01</i> | <i>ITS1</i> | entfällt komplett |
| | <i>ITS2</i> | <i>Aspergillus glaucus</i> , <i>Cladosporium herbarum</i> , <i>Trichoderma viride</i> |
| | <i>TUB2</i> | <i>Trichoderma viride</i> |
| | <i>TUB2 - Exon</i> | <i>Cladosporium herbarum</i> , <i>Epicoccum nigrum</i> , <i>Mucor mucedo</i> , <i>Trichoderma viride</i> |
| | <i>TEF1</i> | <i>Alternaria alternata</i> , <i>Alternaria tenuissima</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Aureobasidium pullulans</i> |
| | <i>TEF1 - Exon</i> | <i>Aureobasidium pullulans</i> |
| <i>Muscle_02</i> | <i>ITS1</i> | kein Schimmelpilz entfällt, nur Sequenzlöschung |
| | <i>ITS2</i> | <i>Aspergillus glaucus</i> , <i>Cladosporium herbarum</i> |
| | <i>TUB2 - Exon</i> | <i>Cladosporium herbarum</i> , <i>Epicoccum nigrum</i> , <i>Mucor mucedo</i> , <i>Trichoderma viride</i> |

Für den Marker *ITS1* unter Verwendung *Muscle_01* war eine Optimierung des MSAs auf Grund der zu großen Sequenzunterschiede nicht möglich. Eine Berechnung der phylogenetischen Bäume wäre nur für artverwandte Schimmelpilze möglich gewesen, was der Intension dieses Ansatzes widerspricht und in Ansatz 5 untersucht wird. Des Weiteren erfolgte wie in Ansatz 3 beschrieben eine Separierung des *TUB2* - Datensatzes.

Tabelle 17 - 5.2 Datensatzseparierung für *TUB2*

Im Folgenden ist die Separierung des *TUB2* - Datensatzes beschrieben, in welchem die Teildatensätze der Schimmelpilze enthalten sind. Des Weiteren gilt diese Separierung nur für *Muscle_01*.

| | |
|-------------------|---|
| <i>TUB2_klein</i> | <i>Alternaria alternata, Alternaria tenuissima, Aspergillus niger, Aspergillus penicillioides, Aspergillus glaucus, Aspergillus versicolor, Aspergillus vitis, Aureobasidium pullulans, Cladosporium cladosporioides, Cladosporium herbarum, Epicoccum nigrum, Fusarium oxysporum, Fusarium solani, Mucor mucedo, Penicillium chrysogenum, Penicillium funiculosum, Trichoderma harzianum, Trichoderma viride</i> |
| <i>TUB2_groß</i> | <i>Alternaria alternata, Alternaria tenuissima, Aspergillus niger, Aspergillus penicillioides, Aspergillus glaucus, Aspergillus versicolor, Aspergillus vitis, Aureobasidium pullulans, Cladosporium cladosporioides, Cladosporium herbarum, Fusarium oxysporum, Fusarium solani, Mucor mucedo, Penicillium chrysogenum, Trichoderma harzianum,</i> |

Nach der zusätzlichen Aufbereitung der einzelnen Datensätze wurden erneut MSAs unter der Parametereinstellung von *Muscle_01* sowie *Muscle_02* generiert und anschließend unter Verwendung von *Neighbor - Joining* und *UPGMA* die phylogenetischen Bäume berechnet.

Kapitel 5.3 Phylogenetische Bestimmung der Schimmelpilze für ihrer Arten

Ansatz 5: Artspezifische phylogenetische Bestimmung (*ClustalW*)

Da neben der Differenzierung der Gattungen auch die Differenzierung der Arten relevant ist, wurde der Datensatz für eine artspezifische Analyse angepasst. In diesem Fall wird jede Art durch ihre Marker, welchen der Datensatz enthält, unterschieden.

Tabelle 18 - 5.3 Datensatz für die artspezifische phylogenetische Bestimmung

Diese Tabelle zeigt, welche Vertreter einer Gattung unter Verwendung des sequenziellen Marker unterschieden werden sollen.

| Gattung | Art | Marker |
|---------------------|--|---|
| <i>Alternaria</i> | <i>alternata, tenuissima</i> | <i>ITS1, ITS2, TUB2, TUB2 - Exon, RPB2</i> |
| <i>Aspergillus</i> | <i>glaucus, niger, penicillioides, versicolor, vitis</i> | <i>ITS1, ITS2, TUB2, TUB2 - Exon, RPB2</i> |
| <i>Cladosporium</i> | <i>cladosporioides, herbarum</i> | <i>ITS1, ITS2, TUB2, TEF1, TEF1 - Exon, ACT, ACT - Exon</i> |
| <i>Fusarium</i> | <i>oxysporum, solani</i> | <i>ITS1, ITS2, TUB2, TUB2 - Exon, RPB2, TEF1, TEF1 - Exon, TOP2</i> |
| <i>Penicillium</i> | <i>chrysogenum, funiculosum,</i> | <i>ITS1, ITS2, TUB2, TUB2 - Exon</i> |
| <i>Trichoderma</i> | <i>harzianum, viride</i> | <i>ITS1, ITS2, TUB2, TUB2 - Exon, RPB2, TEF1, TEF1 - Exon</i> |

Zu Beginn erfolgte die Generierung eines MSAs unter der Verwendung von *ClustalW*. Wie in Ansatz 3 beschrieben, wurden zwei separate MSA - Methoden durch *ClustalW* realisiert. Die dafür definierten Parameter sind der Tabelle 8 - 5.1 sowie der Tabelle 12 - 5.2 zu entnehmen. Anschließend erfolgte eine Berechnung der phylogenetischen Bäume unter Verwendung von *NJ* und *UPGMA*. Die Parameter sind in der Tabelle 9 - 5.1 beschrieben. Da nicht für alle Marker ein Baum berechnet werden konnte, musste der Datensatz optimiert und die dazugehörigen MSA sowie die phylogenetischen Bäume neu berechnet werden.

Tabelle 19 - 5.3 Entfallene Arten nach der Optimierung des Datensatzes

Im Folgenden werden die Arten gezeigt, welche durch die Optimierung des Datensatzes für bestimmte Marker entfallen sind. Überwiegend wurden nur Sequenzen mit suboptimaler Länge für jede Art entfernt.

| MSA | Gattung | Marker | Entfallene Art |
|-------------|---------------------|--------------------|-------------------------|
| ClustalW_01 | <i>Aspergillus</i> | <i>ITS2</i> | <i>glaucus</i> |
| | <i>Penicillium</i> | <i>ITS2</i> | nur Sequenzen entfallen |
| ClustalW_02 | <i>Cladosporium</i> | <i>ITS2</i> | nur Sequenzen entfallen |
| | <i>Penicillium</i> | <i>ITS2</i> | nur Sequenzen entfallen |
| | | <i>TUB2 - Exon</i> | nur Sequenzen entfallen |

Ansatz 6: Artspezifische phylogenetische Bestimmung (*Muscle*)

Dieser Ansatz stellt eine alternative Berechnung des MSAs durch die Verwendung von *Muscle* dar. Wie in Ansatz 4 beschrieben, erfolgte eine Separierung von *Muscle* durch unterschiedliche Parametereinstellungen, die der Tabelle 15 - 5.2 zu entnehmen sind. Die Datengrundlage entspricht derselben wie in Tabelle 18 - 5.3 beschrieben. Für die Berechnung der phylogenetischen Bäume wurden dieselben Algorithmen sowie Parameter verwendet wie in den Ansätzen zuvor. Des Weiteren entstanden Probleme bei der Berechnung der phylogenetischen Bäume auf Grund divergenter MSAs. Ein möglicher Grund könnten die unterschiedlichen Längen der DNA - Sequenzen sein. Daher wurde der Datensatz überarbeitet und das zuvor erklärte Verfahren für diesen Ansatz wiederholt.

 Tabelle 20 - 5.3 Entfallene Arten nach der Optimierung des Datensatzes

Dargestellt sind die Marker, für welche eine Optimierung des Datensatzes notwendig war. Des Weiteren wurden eventuell entfallene Arten von Schimmelpilzen aufgelistet.

| MSA | Gattung | Marker | Entfallene Art |
|------------------|--------------------|--------------------|-------------------------|
| <i>Muscle_01</i> | <i>Alternaria</i> | <i>TUB2 - Exon</i> | nur Sequenzen entfallen |
| | <i>Aspergillus</i> | <i>ITS1</i> | <i>glaucus</i> |
| | | <i>ITS2</i> | <i>glaucus</i> |
| | <i>Fusarium</i> | <i>TUB2</i> | nur Sequenzen entfallen |
| | | <i>TUB2 - Exon</i> | nur Sequenzen entfallen |
| | <i>Penicillium</i> | <i>ITS2</i> | nur Sequenzen entfallen |
| | <i>Trichoderma</i> | <i>ITS2</i> | nur Sequenzen entfallen |
| | | <i>TEF1</i> | nur Sequenzen entfallen |
| <i>Muscle_02</i> | <i>Fusarium</i> | <i>TUB2 - Exon</i> | nur Sequenzen entfallen |
| | <i>Penicillium</i> | <i>ITS2</i> | nur Sequenzen entfallen |

Zusätzlich erfolgte eine Separierung des *TUB2* - Markers für die Gattung *Fusarium*. Separiert wurde nach dem Kriterium der Sequenzlänge mit einer Grenze von 100bp.

Kapitel 5.4 Zusammenfassung der Ansätze

In diesem Unterkapitel erfolgt eine Zusammenfassung der sechs verschiedenen Ansätze für die phylogenetischen Analysen der Schimmelpilze. Die sechs Ansätze sind in der folgenden Abbildung dargestellt:

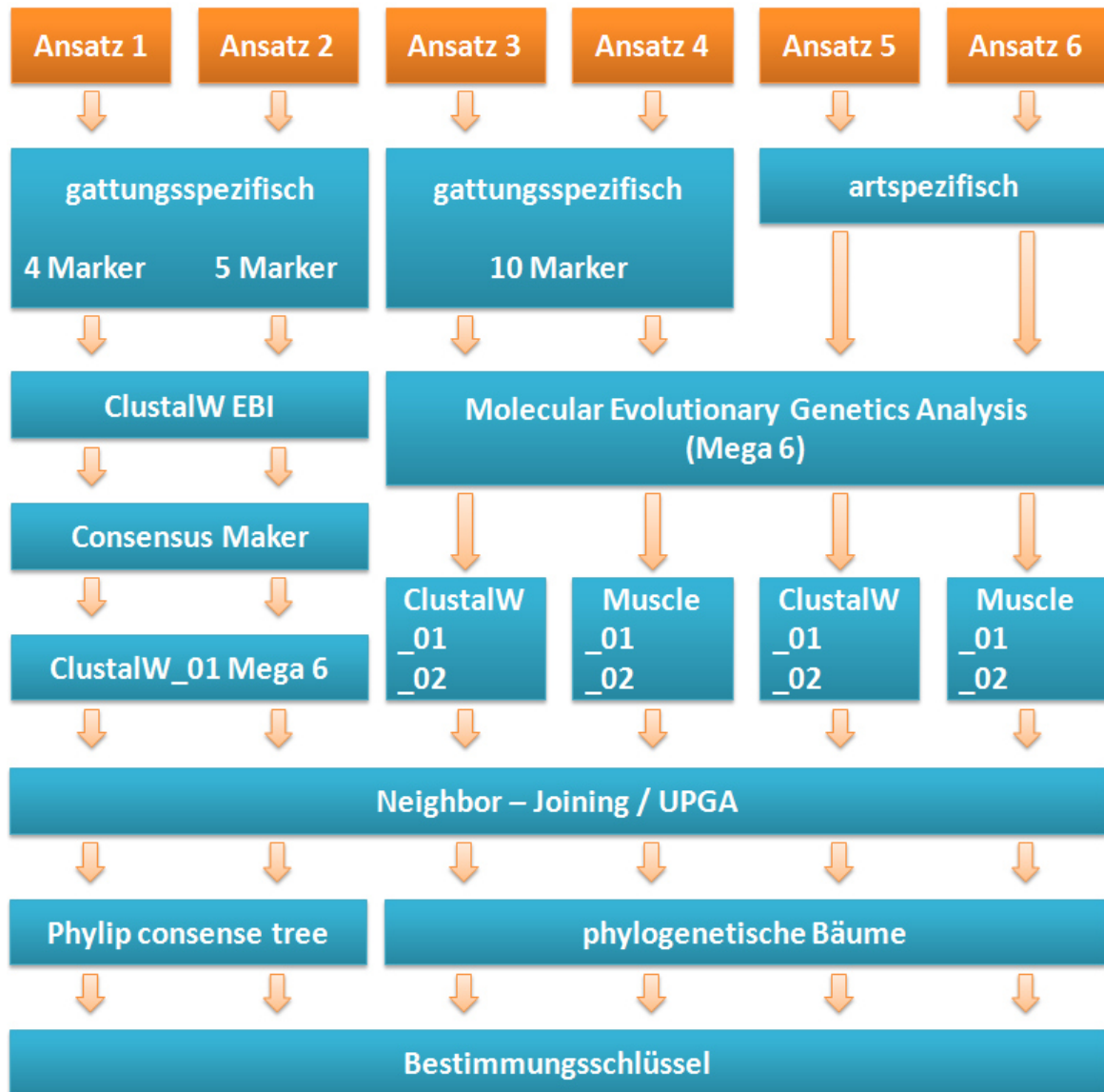


Abbildung 15 - 5.4 Zusammenfassung der Ansätze

Die Grafik beschreibt sechs unterschiedliche Herangehensweisen für die phylogenetische Analyse der Schimmelpilze.

Die Ansätze 1 und 2 beziehen sich auf die Betrachtung der unterschiedlichen Gattungen und unterscheiden sich in ihrer Anzahl an verwendeten Marker und der daraus resultierenden Anzahl an Schimmelpilzen. Für beide Ansätze erfolgte die Ermittlung der Konsensussequenzen (markerspezifisch) aus den zuvor berechneten MSAs. Die markerspezifischen Gattungen (Konsensussequenz) wurden für eine weiter Berechnung von MSAs zusammengefasst. Unter der Verwendung von *Neighbor - Joining* und

UPGMA wurden die phylogenetischen Bäume berechnet. Mittels *Phylip's* *consense* wurden die Konsensusbäume für *NJ* und *UPGMA* unter Verwendung aller Marker der jeweiligen Ansätze konstruiert.

In den Ansätzen 3 und 4 wurden alle verfügbaren Marker für eine gattungsspezifische Analyse verwendet. Die Ansätze unterscheiden sich erstens durch die Wahl der MSA - Algorithmen *ClustalW* und *Muscle* sowie zweitens durch die verschiedenen Parametereinstellungen (gekennzeichnet durch _01 bzw. _02). Gegenstand des Ansatzes 5 und 6 waren die Untersuchungen der phylogenetische Unterschiede der einzelnen Arten. Die Datengrundlage war, dass alle vorhandenen Marker für jede Art berücksichtigt wurden. Die Durchführung zur Berechnung der MSAs ist äquivalent zu den Ansätzen 3 und 4. Für die Berechnungen der phylogenetischen Bäume wurden für die Ansätze 3, 4, 5 und 6 die Algorithmen *Neighbor - Joining* und *UPGMA* verwendet.

Anmerkung: In Kapitel 4.1 wurde beschrieben, dass *Mega* 6 Codon spezifische Multipel - Sequenz - Alignments für *ClustalW* und *Muscle* unterstützt. Diese wurden auch als Ansätze für phylogenetische Charakterisierungen der Art - und Gattungsvergleiche realisiert. Es zeigte sich im Nachhinein, dass auch unter Berücksichtigung des genetischen Codes für Schimmelpilze kein im biologischen Kontext stehendes MSA generiert werden konnte. Dies lässt sich auf fehlende Start - Codons in den Sequenzen zurückführen. Da auch aus den *Flat - File* - Annotationen keine Informationen über Position des Start - Codons oder des *open reading frames* entnommen werden konnten, wurden diese Ansätze letztendlich verworfen.

Kapitel 6 Ergebnisse der Ansätze aus den phylogenetischen Analysen und ihre Bedeutungen

In diesen Kapitel werden die berechneten phylogenetischen Bäume der sechs Ansätze aus Kapitel 5 präsentiert und diskutiert. Hierfür erfolgt eine Unterteilung der Bäume bezüglich des *UPGMA* - und *Neighbor - Joining* - Algorithmus.

Kapitel 6.1 Ansatz 1

UPGMA

Für die *ITS1* - Region zeigt sich, dass *Alternaria* - Arten zusammen mit *Aspergillus penicillioides* und *Aspergillus niger* gruppiert wurden. Durch Betrachtung des MSAs fällt auf, dass die vier Konsensussequenzen der Schimmelpilze zu 100% identisch sind, wodurch sich die zuvor erwähnte Gruppierung begründet. *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus versicolor*, *Cladosporium cladosporioides*, *Aureobasidium pullulans* sowie die *Fusarium* - Arten weisen zueinander eine geringe Distanz auf. *Trichoderma* - Arten zeigen die größte Distanz in diesem Baum zueinander auf, wonach von einer Abgrenzung durch *ITS1* gesprochen werden kann. Im Vergleich zur *ITS1* - Region lässt sich mit dem *ITS2* - Marker keine Separierung der *Trichoderma* - Arten aufzeigen, da diese zusammen gruppiert wurden. Eine Trennung kann nur für die Schimmelpilze *Aureobasidium pullulans*, *Aspergillus versicolor* und *Aspergillus vitis* festgestellt werden, wobei die dazu gehörigen *Bootstrap* - Werte (Bt - Wert, siehe Kapitel 4.5) unter 30 liegen, wodurch eine Signifikanz ausgeschlossen werden kann. Wie bei *ITS1* wurden die *Alternaria* - Arten, *Aspergillus penicillioides* und *Aspergillus niger* gemeinsam gruppiert. Auch in diesem MSA sind die Konsensussequenzen zu 100% identisch. Dieser Fall tritt des Weiteren auch auf die Marker *RPB2* und *TUB2* zu. Von dieser Gruppierung wird im Verlauf als Vierer - Cluster die Rede sein. Für den Marker *RPB2* zeigt sich, dass eine Trennung für alle Gattungen aber keine Artentrennung möglich war, da sämtliche Schimmelpilze (ausgenommen der Vierer - Cluster der *Alternaria* - Arten und zweier *Aspergillus* - Arten) artgleich miteinander gruppiert wurden.

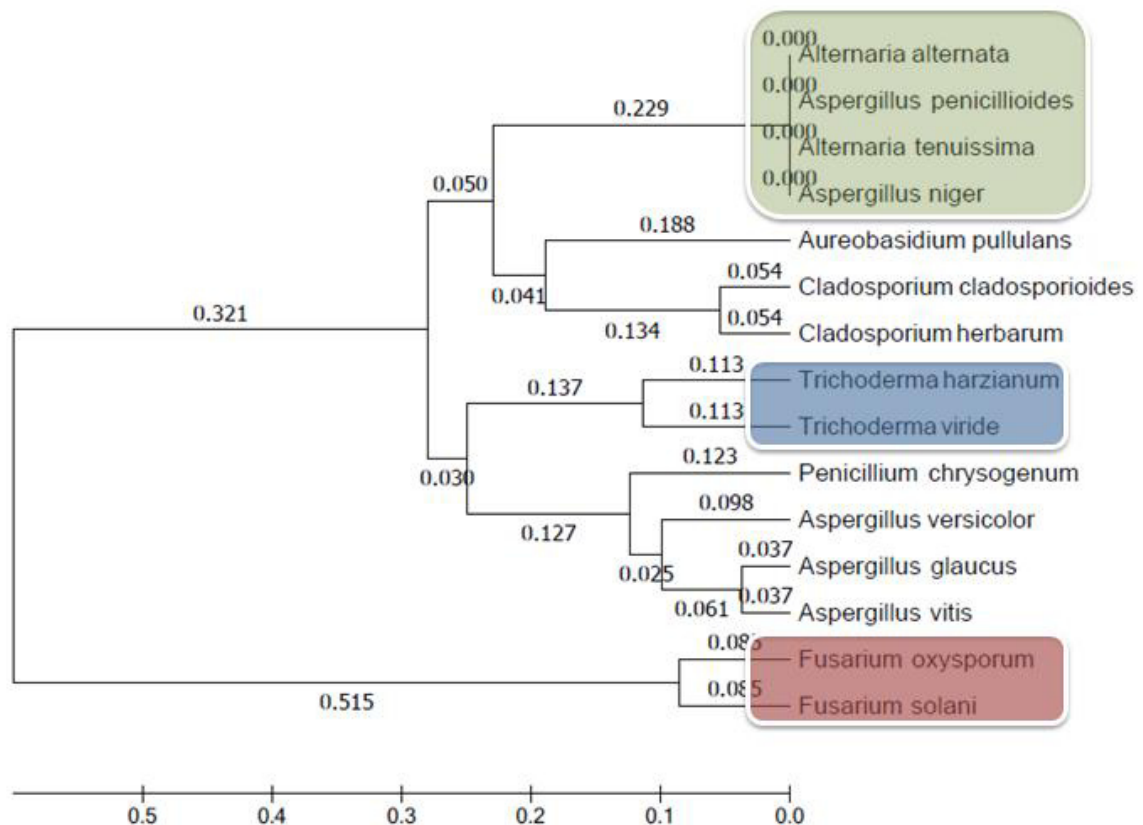


Abbildung 16 - 6.1 UPGMA - RPB2

Dargestellt ist der UPGMA - Baum für den RPB2 - Marker. Grün markiert wurde das Vierer - Cluster. Des Weiteren sind die Gattungsunterscheidungen speziell für die Schimmelpilze *Trichoderma* (blau) und *Fusarium* (rot) abgebildet. Die Zahlen repräsentieren die Distanzen zwischen den unterschiedlichen OTUs.

Die *Bootstrap* - Werte liegen über 80%. Der phylogenetische Baum für den *TUB2* - Marker zeigt eine Trennung der *Fusarium* -, *Cladosporium* - sowie *Trichoderma* - Gattungen. *Aspergillus* - Arten spalten sich in zwei Gruppen mit der größten Distanz im Baum auf, dabei sind *Aspergillus vitis* mit *Aspergillus versicolor* und *Aspergillus niger* mit *Aspergillus penicillioides* gruppiert. Die Einordnung von *Penicillium chrysogenum* besitzt nach Betrachtung des Bt -Wertes eine Wahrscheinlichkeit von 50%.

Der Konsensusbaum macht deutlich, dass durch die Marker eine Gattungsunterscheidung nicht aber eine Artentrennung möglich ist. Hierbei wurden die Arten von *Trichoderma*, *Cladosporium*, *Fusarium* untereinander gruppiert. *Aureobasidium pullulans* lässt sich bei den *Aspergillus* - Arten *versicolor* und *vitis* einordnen. Diese *Aspergillus* - Arten sind weit von den beiden anderen *Aspergillus* - Arten *penicillioides* und *niger* gruppiert. Obwohl zuvor für alle Marker das Vierer - Cluster entstand, wurden diese nicht im Konsensusbaum zusammengefasst.

Phylogenetic tree showing relationships among Ascomycota species. The tree is rooted at the bottom left. Bootstrap values are indicated at the nodes. The tree is divided into three main clades highlighted by colored boxes:

- Green box (top right):** *Aspergillus niger*, *Aspergillus penicillioides*, *Alternaria tenuissima*, *Alternaria alternata*.
- Blue box (bottom left):** *Trichoderma viride*, *Trichoderma harzianum*.
- Red box (bottom right):** *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*.

Other species shown include *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium herbarum*, *Aureobasidium pullulans*, *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus glaucus*, and *Aspergillus vitis*.

Scale bar: 0.1

Auch unter Verwendung des *Neighbor - Joining* - Algorithmus kann das Vierer - Cluster (grün) erkannt werden. Die *Fusarium* - Arten (rot) wurden ebenfalls miteinander gruppiert (Vergleich Abb. 6.1. - 1). Des Weiteren fällt auf, dass eine Gruppierung für die *Trichoderma* - Arten (blau) nicht erfolgte. Die Distanzen ähneln denen von Abbildung 16 - 6.1.

Für den *TUB2* - Marker erfolgten gestaffelte Gruppierungen in *NJ*. Es handelt sich dabei um die Schimmelpilze *Cladosporium herbarum*, *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus vitis*, *Aspergillus versicolor* und *Aureobasidium pullulans*. In beiden Fällen sind die Distanzen sowie die BT - Werte bezüglich dieser Schimmelpilze beider Algorithmen sehr gering.

Einen Unterschied zwischen den Konsensusbäumen von *NJ* und *UPGMA* gibt es für die Topologie. In diesem Fall ist das Vierer - Cluster weit voneinander getrennt. Des Weiteren gibt es keine eindeutige Gattungsseparierung, da andere Gattungen in einem Cluster zusammen gruppiert wurden. Auch lässt sich aus der Gattung *Aspergillus*, welche mit ihren Arten am meisten in dem Daten vertreten ist, keine Gemeinsamkeit schlussfolgern. Der Konsensusbaum ist in der folgenden Abbildung zu erkennen:

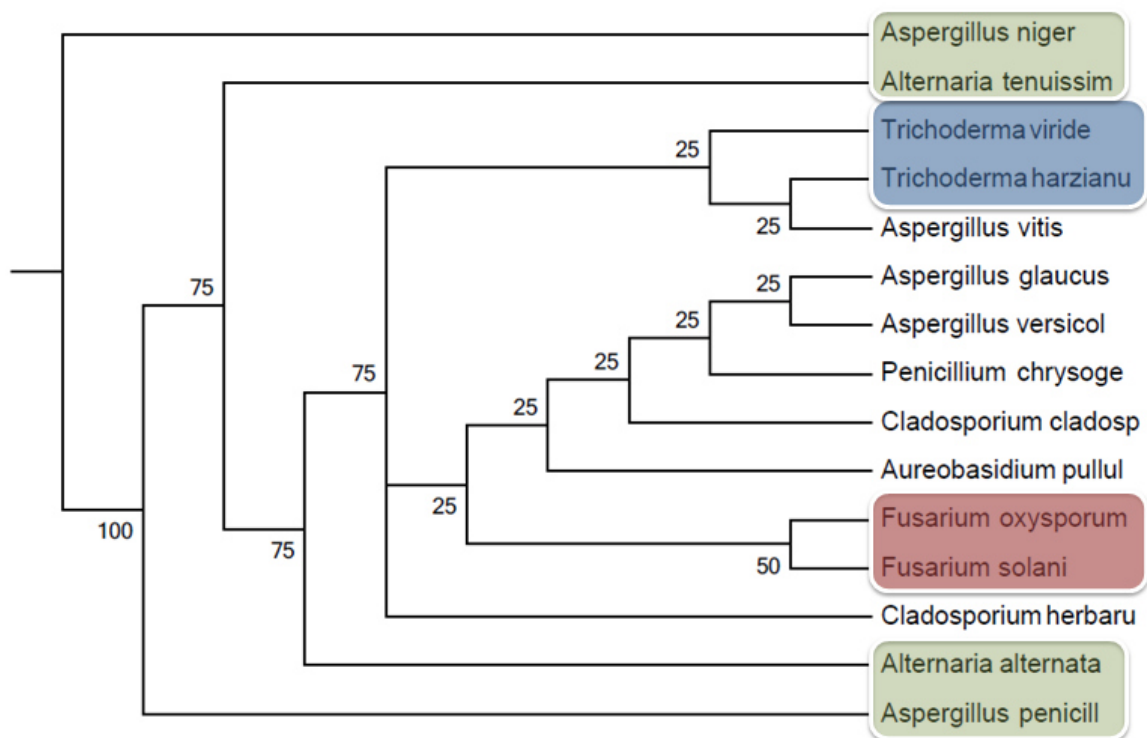


Abbildung 18 - 6.1 NJ - Konsensusbaum

Die Abbildung zeigt, dass das Vierer - Cluster (grün) nicht existiert, obwohl es in jedem Marker aus welchen der Konsensusbaum berechnet wurde, vorhanden ist. Des Weiteren sind die Gattungen *Trichoderma* (blau) und *Fusarium* (grün) in dem Konsensusbaum gruppiert. Die Zahlen repräsentieren die Häufigkeit der Gruppierung in den zu Grunde liegenden Bäumen. Dies bedeutet, dass die Gruppierung der *Fusarium* - Arten zu 50% in den Markern erfolgte. Diese 50% entsprechen auch dem tatsächlichen Häufigkeiten.

Anmerkung: Die fehlenden Namensendungen entstanden auf Grund von Konvertierungsfehler durch das Programm *consense*.

Zusammenfassung Ansatz 1

Für die phylogenetischen Bäume aus Ansatz 1 zeigt sich, dass vier Schimmelpilze (*Alternaria alternata*, *Alternaria tenuissima*, *Aspergillus niger* und *Aspergillus penicillioides*) für jeden Marker untereinander gruppiert wurden, dies bedeutet, dass die gewählten Marker zu keiner Unterscheidung dieser Schimmelpilze verwendbar sind. Dies lässt sich auf die Konsensussequenzen zurückführen, welche in Betrachtung der einzelnen Marker nach dem Entfernen der Gaps zu 100% identisch waren. Es wurde des Weiteren gezeigt, dass sich durch den Marker *ITS1* *Fusarium* - Arten unterscheiden lassen. Eine Separierung der Gattungen ist speziell durch den Marker *ITS2* für *Trichoderma* und dem Marker *RPB2* möglich. Jedoch sind diese Bäume auf Grund teilweiser niedriger *Bootstrap* - Werte nur von geringer Signifikanz.

Die unterschiedlichen Konsensusbäume lassen sich durch die *Majority* - Regel erklären, da die grundlegende Anzahl der Bäume für eine 50%ige Häufigkeit von Gruppierungen schlecht zu realisieren ist. In beiden Fällen zeigt sich, dass die Topologie der Konsensusbäume teilweise durch eine Häufigkeit von 25% konstruiert wurde.

Kapitel 6.2 Ansatz 2

UPGMA

Für alle betrachteten Marker zeigt sich, dass das Vierer - Cluster aus *Alternaria tenuissima*, *Aspergillus penicillioides*, *Alternaria alternata* und *Aspergillus niger* gebildet wurde wie in Kapitel 6.1 beschrieben. Interessant ist, dass dieses Vierer - Cluster auch auf den Marker *TUB2* - Exon zutrifft. Für *ITS1* gilt des Weiteren, dass eine Artenunterscheidung für *Trichoderma* realisiert wurde. Für die Gattung *Fusarium* zeigt sich eine nahe Verwandtschaft zu *Penicillium chrysogenum*, *Aureobasidium pullulans* und *Trichoderma viride*. *Aspergillus vitis* besitzt eine Gruppierung zu *Trichoderma harzianum* und eine größere Distanz zu den anderen *Aspergillus* - Arten. Die Bt - Werte liegen im allgemeinen über 90%, was auf einen signifikanten Baum schließen lässt.

Eine eindeutige Gattungsseparierung für *Trichoderma* zeigt sich für den *ITS2* - Marker. Des Weiteren besitzt diese Gattung eine Gruppierung zu *Aspergillus vitis*, welcher wiederum eine große Distanz zu den enthaltenen *Aspergillus* - Arten des Vierer - Clusters aufweist. Dem Cluster werden die *Fusarium* - Arten und der Schimmelpilz *Penicillium chrysogenum* zugeordnet. *Aureobasidium pullulans* liegt separiert zu den beschriebenen Clustern und lässt sich durch den *ITS2* - Marker gut beschreiben. Die Bt - Werte liegen um die 80% bis 90%. Der *RPB2* - Marker zeigt, dass *Fusarium* die größte Distanz zu

allen Schimmelpilzen besitzt. *Trichoderma* - Arten wurden untereinander gruppiert. Eine weitere Gruppierung bilden *Aspergillus vitis* und *Penicillium chrysogenum*, was zeigt, dass *Aspergillus vitis* keine nahe Verwandtschaft mit die anderen *Aspergillus* - Arten besitzt. Zusätzlich gruppiert sich *Cladosporium herbarum* mit dem Vierer - Cluster. Im Gegensatz zu den *ITS* - Markern liegt der *Bt* - Wert teilweise unter 20 % für die Cluster der *Aspergillus* -, *Cladosporium* -, *Aureobasidium* - Gattungen. Für den *TUB2* - *Exon* - Marker konnte eine Artenseparierung für *Trichoderma* gezeigt werden. Des Weiteren ist der Schimmelpilz *Fusarium solani* für sich stehend und wird durch eine größere Distanz mit dem Vierer - Clustern gruppiert. Die restlichen Schimmelpilze bilden ein eigenständiges Cluster mit sehr geringer Distanz zueinander. *Trichoderma harzianum* bildet die *Outgroup* für den Baum des *TUB2* - Markers und besitzt die größte Distanz zu *Trichoderma viride*. Letzterer Schimmelpilz gruppiert sich mit dem Vierer - Cluster. Als alleinstehende Gruppierung zeigen sich die *Fusarium* - Arten. *Cladosporium herbarum*, *Aureobasidium pullulans* und *Aspergillus vitis* bildenden eine Gruppierung, besitzen aber zueinander eine große Distanz. Die *Bt* - Werte sind für diesen Marker sehr unterschiedlich. Für *Cladosporium herbarum*, *Aspergillus vitis*, *Aureobasidium pullulans* und *Penicillium chrysogenum* liegen die Werte unter 50% und über 80% für die übrigen Cluster.

Im Gegensatz zu Ansatz 1 zeigt der Konsensusbaum, dass das Vierer - Cluster topologiebasierend enthalten ist. Des Weiteren kann dem Baum entnommen werden, dass die *Fusarium* - Arten eine nahe Verwandtschaft zueinander besitzen. Auch ist eine Gruppierung der *Trichoderma* - Arten zu erkennen, welche zusätzlich *Aspergillus vitis* zugeordnet ist. Basierend auf dem Topologiebaum ist keine Verwandtschaft zwischen *Aspergillus vitis* und der anderen *Aspergillus* - Arten (enthalten in dem Vierer - Cluster) zu erkennen. Der Schimmelpilz *Cladosporium herbarum* ist für sich stehend und würde eher dem Vierer - Cluster zugeordnet werden. Eine weitere Gruppierung gibt es für *Penicillium chrysogenum* und *Aureobasidium pullulans*. Bezüglich der Häufigkeiten lässt sich für den Konsensusbaum im Vierer - Cluster und *Fusarium* - Cluster mehr als 90% angeben. Die übrigen Cluster konstruierten sich aus 20%iger bis 40%iger Häufigkeit der auftretenden Gruppierungen in den *UPGMA* - Bäumen.

Neighbor - Joining

Auch bei *Neighbor - Joining* ließen sich für alle Marker das Vierer - Cluster erkennen. Für den Marker *ITS1* sind keine anderen Gruppierungen im Vergleich zu *UPGMA* vorliegend. Unterschiedlich sind die Distanzen sowie die *Bt* - Werte, welche unter 30% liegen

(ausgenommen das Vierer - Cluster mit 90%). Der Baum für den *ITS2* - Marker unterscheidet sich durch die Einordnung von *Aureobasidium pullulans*, welcher sich unter der Gruppierung von *Cladosporium herbarum* als Subcluster für das Vierer - Cluster bildet. Auch in diesem Fall liegen die Bt - Werte unter 30 %. Für *RPB2* zeigt sich, dass *Fusarium* die größte Distanz zu den anderen Schimmelpilzen besitzt. Die Gruppierung von *Trichoderma* erfolgt schon zu Beginn des Baumes, wodurch *Trichoderma* zu den verbleibenden Schimmelpilzen die größte Gemeinsamkeit aufweist. Die weiteren Gruppierungen entsprechen derer von *UPGMA*. Die Bt - Werte zeigen mit über 80% eine höhere Signifikanz für Phylogenie als bei den *ITS* - Markern. Der *TUB2* - *Exon* - Marker bildet dieselben Gruppierungen wie der *UPGMA* - Algorithmus. Bei beiden Bäumen liegen die Bt - Werte zwischen 60% und 90%. *Trichoderma harzianum* bildet nicht wie in *UPGMA* eine *Outgroup* für den Marker *TUB2*, besitzt aber den größten Abstand zu *Trichoderma viride*. Des Weiteren entsprechen die Gruppierungen der anderen Schimmelpilze derer in *UPGMA*. Die Bt - Werte liegen unter in einem Intervall von 8% bis 90%, was eine geringe Signifikanz der Phylogenie bedeuten kann.

Im Vergleich zu *UPGMA* wurden das Vierer - Cluster nicht komplett in dem Konsensusbaum konstruiert, da *Alternaria alternata* als *Outgroup* definiert wurde, was einer 100%igen Häufigkeit der *NJ* - Bäume entsprechen soll. Die *Fusarium* - Arten wurden zusammen gruppiert, gefolgt von *Trichoderma harzianum*, welcher bezüglich *Trichoderma viride* mit größerem Abstand zugeordnet wurde. Als Gruppierung können auch die Schimmelpilze *Cladosporium herbarum*, *Aureobasidium pullulans* und *Penicillium chrysogenum* aufgefasst werden. Sämtliche Gruppierungen wurden aus einer Häufigkeit von 20% bis 60% konstruiert.

Zusammenfassung Ansatz 2

Für den Ansatz 2 zeigt sich, dass vor allem *Trichoderma* - Arten durch die Marker *ITS1*, *RPB2*, *TUB2* - *Exon* und *TUB2* differenzierbar sind. Die Gattung *Fusarium* wurde in allen Markern durch ihre Arten zusammengefasst, was eine Artunterscheidung durch die Wahl dieser Marker nicht ermöglicht. Dafür konnte die Gattung von anderen Gattungen separiert werden. Eine Gattungsseparierung war bezüglich des *ITS2* - Markers auch für *Trichoderma* möglich. Auffallend ist des Weiteren, dass *Aspergillus vitis* von den anderen *Aspergillus* Arten trennbar durch alle Marker war. Wie in Ansatz 1 entstand ein Cluster von *Aspergillus penicillioides*, *Alternaria alternata* und *Aspergillus niger*, welches auch in *TUB2* - *Exon* gefunden wurde. Dadurch ist eine Unterscheidung von *Alternaria* - Arten sowie der zwei *Aspergillus* - Arten nicht möglich. Hinzu kommt, dass keine

Gattungsseparierung für *Alternaria* - und *Aspergillus* - Arten möglich ist (ausgenommen *Aspergillus vitis*).

Kapitel 6.3 Ansatz 3

Dieser Ansatz beschäftigte sich primär mit der Separierung der Gattungen unter Verwendung von ClustalW, welches sich durch zwei verschiedene Parametereinstellungen (*ClustalW_01*, *ClustalW_02*) unterscheidet.

UPGMA, ClustalW_01

Beginnend mit dem Marker *ACT* wurde festgestellt, dass eine Separierung der Gattungen *Cladosporium*, *Trichoderma*, *Epicoccum* möglich war, da sich für diese Schimmelpilze eigenständige Cluster gebildet haben. Zusätzlich erfolgte eine Separierung der beiden *Trichoderma* - Arten, welche übergeordnet miteinander gruppiert wurden. Die Distanz von *Cladosporium* besitzt den größten Abstand zu *Epicoccum*. Beide gruppieren sich mit sich mit *Trichoderma*. Es lässt sich durch die *Bootstrap* - Werte auf einen signifikanten phylogenetischen Baum schließen, da die Werte über 75% liegen. Für den Marker *ACT* - Exon war eine Trennung der Gattungen für *Cladosporium*, *Trichoderma*, *Epicoccum* und *Penicillium* möglich. Kein Erfolg hatte hingegen die Unterscheidung der *Cladosporium* - Arten, da diese ein gemeinsames Cluster bilden. Die *Bt* - Werte liegen für die Cluster bezüglich der Gattungen über 80%. Der *ITS1* - Marker zeigt, dass es keine Unterscheidung der Gattungen gibt. Die *Bt* - Werte liegen unter 10%, wodurch auf keine Aussagekraft des Baumes geschlossen werden kann. Im Gegensatz zu dem *ITS1* - Marker konnte durch die Betrachtung der *ITS2* - Region für die folgenden Gattungen eine Unterscheidung getroffen werden: *Trichoderma*, *Mucor* und *Penicillium*. Für die verbleibenden Gattungen zeigte sich, dass immer wieder gemeinsame Cluster auftreten. Daher kann bei diese Gattungen nicht von einer Differenzierung gesprochen werden. Für den *RPB2* - Marker wurden optimale Ergebnisse für *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium* und *Trichoderma* erzielt. Die Gattung *Aspergillus* ließ sich hingegen nicht von den zuvor genannten Gattungen unterscheiden. Die *Bt* - Werte liegen für die Cluster der getrennten Gattungen zwischen 80% und 100%. Der Baum des Marker *TEF1* zeigt, dass alle drei betrachteten Gattungen in drei entstanden Clustern unterscheidbar sind. Die dabei betrachteten Gattungen waren *Trichoderma*, *Fusarium* und *Cladosporium*. Zusätzlich zeigte sich bei jeder Gattung ein Subcluster, welches die Arten repräsentiert. Interessanterweise ist der Marker *TEF1* -

Exon nicht effektiv, da es sich um einen fehlerkonstruierten Baum handelt. Durch den Marker *TOP2* konnten die Gattungen *Aspergillus*, *Penicillium* und *Fusarium* unterschieden werden. *Aspergillus* sowie *Penicillium* besitzen im Vergleich zu *Fusarium* die geringste Distanz zueinander. Die Bt - Werte liegen zwischen 80% und 95%. Der Marker *TUB2 - Exon* ist bei der Separierung der Gattungen *Fusarium* und *Aspergillus* nicht geeignet, da diese sich in verschiedenen Clustern untereinander gruppiert haben. Eine Unterscheidung ist aber für *Trichoderma*, *Mucor* und *Penicillium* *Alternaria* und *Epicoccum* möglich. Der Marker *TUB2* wurde in diesem Ansatz zu *TUB2_groß* und *TUB2_klein* unterteilt. Für *TUB2_groß* ist dem Baum eine Artenunterscheidung von *Fusarium* zu entnehmen. Die beiden Arten beschreiben die größte Distanz in diesem Baum. Die Separierung der Gattungen ist nur für *Penicillium* zu erkennen. Die anderen Gattungen besitzen ein zu diverses Cluster. Für den Marker *TUB2_klein* lässt sich keine Separierung der Gattungen erkennen, da die einzelnen Schimmelpilze keine signifikanten Cluster bilden.

Neighbor - Joining, ClustalW_01

Die Unterscheidungen der Gattungen entsprechen denen von *UPGMA* für die Marker *ACT*, *ACT - Exon*, *ITS2*, *RPB2*, *TEF1*, *TOP2* und *TUB2_klein*. Die *Bootstrap* - Werte liegen für die Cluster des Markers *ACT* bei ca. 40%, *ACT - Exon* bei 50%, was bedeutet, dass eine Aussage über die Verwandtschaft der Gattungen nicht signifikant sein kann. Die Bt - Werte der anderen Marker liegen zwischen 70% und 100%. Die *ITS2* - Region lässt dieselben Trennungen erkennen wie in dem *UPGMA* - Baum mit ähnlichen Bt - Werten. *TUB2 - Exon* differenziert sich zu *UPGMA* durch eine zusätzliche Artenunterscheidung der Gattungen *Alternaria* und *Aspergillus*. *TUB2_klein* unterscheidet die Arten von *Fusarium*, jedoch weisen diese einen geringen Abstand zueinander auf im Gegensatz zu dem Abstand des *UPGMA* - Baumes. Des Weiteren konnte für die Gattung *Aspergillus* ein eigenständiges Cluster definiert werden. Für *ITS1* und *TEF1* lassen sich keine Aussagen treffen, da die Bäume eine Fehlerkonstruktion waren mit der Begründung, dass die Distanzen der Astlängen null aufweisen.

Zusammenfassung Ansatz 3 ClustalW_01

Die Betrachtung der phylogenetischen Bäume zeigt für *UPGMA* und *NJ*, dass vor allem die Gattungen *Trichoderma*, *Cladosporium*, *Mucor* und *Epicoccum* durch die Marker *ACT*, *ACT - Exon*, *ITS2*, *RPB2*, *TEF1*, *TUB2 - Exon* sowie *TUB2_klein* unterschieden

werden können, wobei die optimalen Ergebnisse durch *ACT*, *TEF1* und *RPB2* beschrieben werden. Des Weiteren kommt hinzu, dass eine Artentrennung für *Cladosporium*, *Aspergillus*, und *Fusarium* möglich war. Es muss berücksichtigt werden, dass die Unterscheidung der Arten für *Aspergillus* und *Fusarium* durch die Verwendung des *Neighbor - Joining* - Algorithmus realisiert wurde. Auffallend ist, dass die Bt - Werte im Durchschnitt schlechter bei *NJ* - Bäumen als die der *UPGMA* - Bäume sind.

UPGMA, ClustalW_02

Für die Parametereinstellungen von *ClustalW_02* zeigt sich, dass die *UPGMA* - Bäume im Vergleich mit denen aus *ClustalW_01* ähnliche Ergebnisse bezüglich der Marker *ACT*, *TEF1*, *TOP2* und *TUB2_groß* präsentieren. Durch den Marker *ACT* konnten die Gattungen *Trichoderma*, *Epicoccum*, *Cladosporium* unterschieden werden. Eine Artenseparierung erfolgte für *Cladosporium*. Die Bt - Werte für die Cluster der Gattungen liegen bei 90%. Der Marker *ACT - Exon* ermöglicht die Unterscheidung von *Cladosporium* und *Epicoccum* nicht aber für *Trichoderma*, da *Trichoderma* den beiden anderen Gattungen zugeordnet wird. Die Bt - Werte liegen zwischen 50% und 100%. Eine Betrachtung des *RPB2* - Markers zeigte, dass eine Unterscheidung der Gattung *Cladosporium* zu verbleibenden Gattungen möglich ist. Das Cluster wird mit einem Bt - Wert von 100% bewertet. Speziell die Gattung *Aspergillus* ist nicht unterscheidbar, da ihre Arten allen anderen Gattungen zugeordnet werden. Für den Marker *TEF1* wird festgestellt, dass wie in den Bäumen *UPGMA* und *NJ* unter der Berücksichtigung von *ClustalW_01* eine Gattungs - und Artentrennung für *Trichoderma*, *Cladosporium* und *Fusarium* möglich war. Die beiden Marker *TUB2_groß* und *TUB2_klein* haben die Gemeinsamkeit, dass eine Artenunterscheidung der Gattung *Alternaria* betrachtet werden kann. Es zeigt sich, dass *TUB2_klein* des Weiteren die Gattung *Epicoccum* separiert. Für die Marker *ITS1*, *ITS2*, *TEF1 - Exon* und *TUB2 - Exon* ist keine Interpretation der Bäume möglich, da diese fehlerhaft konstruiert wurden.

Neighbor - Joining, ClustalW_02

Unter den verwendeten MSA - Einstellungen von *ClustalW_02* zeigen sich erstmals verschiedene aussagekräftige Bäume im Vergleich zwischen dem *UPGMA* - und *NJ* - Algorithmus. Die Gemeinsamkeit, welche die Bäume der beiden Algorithmen haben, ist, dass für die Marker *ITS1*, *ITS2*, *TUB2 - Exon* fehlerhafte Bäume konstruiert wurden. Jedoch lässt sich für *TEF1 - Exon* die Aussage treffen, dass die Gattung *Trichoderma*

von *Cladosporium* und *Fusarium* unterscheidbar ist, da die beide letzteren Gattungen ein gemeinsames Cluster bilden. Der hierfür berechnete Bt - Wert liegt bei 60%. Für *ACT*, *ACT - Exon*, *TOP2* und *TEF1* gibt es keine unterschiedlichen Aussagen bezüglich der Gattungsunterscheidung. Ihre Bt - Werte liegen zwischen 70% und 100%. Der Marker *RPB2* zeigt neben einer Differenzierung von *Cladosporium* noch eine zusätzliche Artenunterscheidung der Gattung *Fusarium* auf. Des Weiteren wurde eine Gattungsseparierung für *Trichoderma*, *Penicillium* und *Fusarium* sowie eine Artenseparierung für *Trichoderma* unter Verwendung des *TUB2*-groß - Markers festgestellt.

Zusammenfassung Ansatz 3 *ClustalW_02*

Es wurde festgestellt, dass auch durch Parameteränderungen für das zugrundeliegende MSA speziell die Gattungen *Trichoderma*, *Cladosporium*, *Fusarium* und *Epicoccum* unterschieden werden konnten. Jedoch wurde festgestellt, dass weniger Bäume für die Auswertung zu betrachten sind, da diese fehlerhaft konstruiert wurden. Des Weiteren zeigt sich, dass die *NJ* - Bäume eine höhere Aussagekraft als die von *UPGMA* besitzen.

Kapitel 6.4 Ansatz 4

Ansatz 4 beschreibt die Unterscheidungen der Gattungen für die Ergebnisse der erstellten Bäume von *UPGMA* und *Neighbor - Joining* unter Verwendung der MSAs aus dem *Muscle* - Algorithmus. Der *Muscle* - Algorithmus wurde in zwei verschiedenen Parametervarianten ausgeführt (*Muscle_01* und *Muscle_02*). Die Ergebnisse werden in diesem Unterkapitel verglichen.

UPGMA, Muscle_01

Für die Marker *ACT*, *ACT - Exon* und *TEF1* konnten dieselben Gattungen unterschieden werden wie in Ansatz 3 beschrieben. Die Bt - Werte für die Marker liegen zwischen 80% und 100%. Die Generierung für einen phylogenetischen Baum war für den *ITS1* - Marker nicht möglich (siehe Kapitel 5.2 Ansatz 4). Des Weiteren zeigt sich für *ITS2* eine Fehlkonstruktion des Baumes. Der Marker *RPB2* verdeutlicht eine Unterscheidung der Gattungen *Trichoderma*, *Cladosporium*, *Fusarium* sowie der Art von *Fusarium*. Für die Bt - Werte zeigt sich ein Intervall von 11% bis 70%. Es fällt auf, dass die Gattung *Aspergillus*

sich mit jeder anderen Gattung gruppiert. Für den Marker zeigt sich, dass die Gattung *Trichoderma* ein gemeinsames Cluster mit *Cladosporium* bildet, beide aber eigene Subcluster besitzen. Daher kann eine Differenzierung der beiden Gattungen angenommen werden. Hinzu kommen die Gattungen *Trichoderma* und *Fusarium*, welche eine Separierung aufweisen. Der Marker *TOP2* zeigt eine Unterscheidung für *Aspergillus*, *Penicillium* und *Fusarium*. Letztere Gattung lässt eine Artenseparierung erkennen. Für die beiden Marker *TUB2* - Exon und *TUB2_groß* wurden die Gattungen *Aspergillus*, *Penicillium* und *Trichoderma* aufgetrennt. *Fusarium* sowie *Alternaria* gruppieren sich mit den zuvor genannten Gattungen. Der Marker *TUB2_klein* lässt eine Differenzierung für *Epicoccum* und *Penicillium* zu.

Neighbor - Joining, Muscle_01

Die *Neighbor - Joining* Bäume weisen für die Marker *ACT*, *ACT - Exon*, *ITS1*, *TEF1*, *TEF1 - Exon*, *TOP2*, *TUB2 - Exon*, *TUB2_groß* und *TUB2_klein* ähnliche Ergebnisse zur Trennung der Gattungen auf, unterscheiden sich aber durch die BT - Werte, welche allgemein schlechter sind. Für den Marker *ITS2* zeigt sich, eine Separierung von *Mucor* zu den anderen Gattungen, welche unter sich keine Aussagekraft besitzen. Eine zusätzliche Gattungsunterscheidung findet sich bei *Alternaria* für den Marker *RPB2*. Die Bt -Werte für die Cluster der Gattungen liegen bei 90%.

Zusammenfassung Ansatz 4 *Muscle_01*

Es konnte festgestellt werden, dass die phylogenetischen Bäume hohe Ähnlichkeit zu den Bäumen unter Verwendung des *ClustalW* - Algorithmus haben. Speziell für die Gattungen *Trichoderma*, *Fusarium* und *Cladosporium* wurde eine Unterscheidung der Gattungen wiederholt festgestellt. Auch ließen sich durch die verschiedenen *TUB2* - Marker die Gattungen *Aspergillus*, *Penicillium* unterscheiden, was bei den vorherigen Ansätzen nicht möglich war.

UPGMA, Muscle_02

Unter Verwendung der veränderten Parameter bezüglich *Muscle* wurden Bäume von geringerer Aussagekraft durch *UPGMA* berechnet. Dies begründet sich auf Grund der Marker *ITS1*, *ITS2*, *TEF1*, *TEF1 - Exon* und *TUB2*, für welche fehlerhafte Bäume

konstruiert wurden. Für die Bäume zeigt sich ein hierarchischer Aufbau der einzelnen OTUs. Die beiden Marker *ACT* und *ACT - Exon* deuten auf eine ähnliche Gattungsunterscheidung wie in den zuvor vorgestellten Ansätzen hin. Dies bedeutet, dass die Unterscheidung für *Trichoderma*, *Fusarium* und *Cladosporium* möglich ist. Die Bt - Werte für *ACT* liegen bei 90% und die Bt - Werte von *ACT - Exon* bei 70%. Für den Marker *RPB2* zeigt sich eine Differenzierung der Gattungen *Trichoderma*, *Fusarium*, *Alternaria* und *Cladosporium*. Speziell die Art *Aspergillus pullulans* ist in einem eigenen Cluster zusammengefasst. Die übrigen *Aspergillus* - Arten gruppieren sich zu anderen Gattungen hinzu. Die Bt - Werte für die Cluster der Gattungen liegen zwischen 30% und 70%. Der *TOP2* - Marker zeigt, dass die Gattungen *Fusarium*, *Aspergillus* und *Penicillium* unterscheidbar sind. Dieses Ergebnis entspricht auch den vorangegangenen Ansätzen. Der Bt - Wert liegt zwischen 60% und 90%. Für den Marker *TUB2 - Exon* ist eine Unterscheidung der Gattungen *Fusarium*, *Alternaria* und *Penicillium* möglich.

Neighbor - Joining, Muscle_02

Die Bäume des *Neighbor - Joining* - Algorithmus zeigen ähnliche Differenzierungen für die Gattungen bezüglich der *UPGMA* - Bäume. Des Weiteren wurde für den Großteil der Marker kein aussagekräftiger Baum berechnet. Unterschiede zwischen *UPGMA* und *Neighbor - Joining* gibt es für den Marker *ACT*. Diesem ist eine zusätzliche Unterscheidung der *Trichoderma* zu entnehmen. Weitere Unterschiede sind die Bt - Werte für *ACT - Exon*, welche zwischen 60% und 90% liegen und daher signifikantere Ergebnisse interpretieren lassen als die des *ACT - Exon* - Baum unter *UPGMA*. Die übrigen Bt - Werte sind denen von *UPGMA* ähnlich.

Zusammenfassung Ansatz 4 Muscle_02

Für *Muscle_02* ließ sich feststellen, dass weitaus weniger Marker für die Auswertung zur Unterscheidung der Gattungen verwendet werden konnten. Vor allem die Marker *TEF1* und *TEF1 - Exon* waren nicht verwertbar, wie es in den vorigen Ansätzen möglich war. Durch die Marker *ACT*, *ACT - Exon*, *RPB2* und *TOP2* wurden jene Gattungen differenziert, welche auch in den bereits zuvor vorgestellten Ansätzen unterschieden werden konnten. Es handelt sich dabei um die Gattungen *Trichoderma*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Penicillium* und *Cladosporium*.

Kapitel 6.5 Ansatz 5

Dieses Unterkapitel beschäftigt sich mit den Ergebnissen der Artenunterscheidung für die *UPGMA* - und *Neighbor - Joining* - Bäume unter Verwendung der MSAs *ClustalW_01* und *ClustalW_02*.

UPGMA, ClustalW_01

Alternaria

Für die Artenunterscheidung von *Alternaria* wurde für den Marker *ITS1* ein Cluster für *Alternaria alternata* festgestellt. Ein zweites Cluster zeigt eine gemeinsame Gruppierung mit *Alternaria tenuissima*. Die Bt - Werte für beide Cluster liegen bei 99%. Der Marker *ITS1* ist nicht für eine Artenunterscheidung geeignet, da keine Cluster entstanden sind, welche die beiden Arten unterscheiden könnten. Die Gruppierungen besitzen Bt - Werte zwischen 40% und 100%. Das Ergebnis von *ITS2* zeigt sich auch für den Marker *RPB2*, in welchem ebenfalls kein Cluster gebildet wurde. Die hierfür berechneten Bt - Werte liegen zwischen 30% und 90%. Die Marker *TUB2* und *TUB2 - Exon* entsprechen dem Ergebnis von *ITS1*. Für beide Marker konnte keine Differenzierung der Arten nachgewiesen werden. Es wurde zwar ein Cluster für *Alternaria alternata* festgestellt, jedoch existiert ein zweites Cluster, welches Gruppierungen mit *Alternaria tenuissima* besitzt. Der Bt - Werte für die Cluster bezüglich *TUB2* liegen bei 99% und für *TUB2 - Exon* bei 44%.

Aspergillus

Der *ITS1* - Marker zeigt mehrere Cluster. Einer dieser Cluster besitzt ausschließlich OTUs von *Aspergillus vitis*, wodurch diese Art von den anderen Arten unterschieden werden kann. Der Bt - Wert für dieses Cluster beträgt 74%. Die Arten *Aspergillus niger*, *Aspergillus penicillioides* und *Aspergillus versicolor* gruppieren sich in jedem der übrigen Cluster untereinander. Bezüglich des Marker *ITS2* sind drei Cluster zu erkennen, welche sich jeweils für die Arten *A. niger*, *A. versicolor* und *A. vitis* separieren. Das Cluster für *A. vitis* besitzt die größte Distanz zu den anderen Clustern. Die Art *A. penicillioides* gruppiert sich mit dem Cluster von *A. versicolor*. Auch für den Marker *RPB2* ist eine Unterscheidung der Arten möglich, da sich jede Art in einem eigenen Cluster befindet. Der Bt - Wert beträgt für die Cluster 100%. Für die Marker *TUB2* und *TUB2 - Exon* konnten die Arten *A. niger*, *A. versicolor*, *A. vitis* und *A. penicillioides* unterschieden

werden. Der Schimmelpilz *Aspergillus glaucus* gruppiert sich mit *A. niger* und *A. versicolor*. Daher ist eine Differenzierung für diese Art nicht möglich. In *TUB2* bildet *A. vitis* die *Outgroup*. Die Bt - Werte liegen für *TUB2* zwischen 30% und 100% und für *TUB2 - Exon* bei 100%.

Cladosporium

Für den Marker *ACT* bildeten sich zwei Cluster, welche die Arten *Cladosporium cladosporioides* und *Cladosporium herbarum* unterschieden. Die BT - Werte beider Cluster betrugen 100%. Bezüglich des Markers *ACT - Exon* bildeten sich ebenfalls zwei Cluster, welche aber keine Unterscheidungen der beiden Arten zuließ. *C. cladosporioides* und *C. herbarum* gruppierten sich in den beiden Clustern untereinander. Die Bt - Werte liegen zwischen 20% und 30%. Es wird vermutet, dass vor allem die Intron - Regionen ausschlaggebend für eine Differenzierung unter Verwendung des Markers *ACT* sind. Für die Marker *ITS1* und *ITS2* war ebenfalls keine Unterscheidung möglich, da beiden Arten sich untereinander gruppierten. Die Bt - Werte für *ITS1* liegen zwischen 60% und 100%. Mit 40% bis 90% waren die Bt - Werte für *ITS2* beziffert. Für die Marker *TUB2*, *TEF1* und *TEF1 - Exon* wurden zwei Cluster gebildet, wodurch eine Unterscheidung der beiden Arten möglich ist. Die Bt - Werte betrugen für *TUB2* sowie *TEF1* 100% und für *TEF1 - Exon* zwischen 40% und 60%.

Fusarium

Der *ITS1* - Marker zeigt, dass zwei Cluster gebildet wurden. Diese Cluster lassen keine Unterscheidungen für die Arten *Fusarium oxysporum* und *Fusarium solani* zu, da diese miteinander in jedem Cluster gruppiert sind. Die Bt - Werte der beiden Cluster liegen bei 60% und 90%. Für den Marker *ITS2* wurden mehrere Cluster gebildet. Eines dieser Cluster besteht aus OTUs der Art *F. oxysporum*. Die übrigen Cluster zeigen Gruppierungen beider Arten. Die Bt - Werte liegen bei 70%. Für die Marker *RPB2*, *TEF1* und *TEF1 - Exon* ist eine Unterscheidung der Arten möglich, da sich zwei Cluster bildeten, welchen jeweils eine Art zugeordnet wurde. Die Bt - Werte der drei Marker liegen zwischen 79% und 100%. Der Marker *TOP2* lässt eine Differenzierung der Arten zu, da die Art *F. solani* als *Outgroup* gebildet wurde mit einem Bt - Wert von 97%. Für *TUB2* wurden mehrere Cluster gebildet, wobei ein Großteil dieser Cluster aus *F. solani* OTUs besteht. Ein Cluster setzt sich aus Gruppierungen der beiden Arten zusammen. Für den Marker *TUB2 - Exon* ist keine Artendifferenzierung möglich. Die Bt - Werte

liegen hierfür bei 100%. Demnach könnten die Intron - Regionen des *TUB2* - Markers für eine Artentrennung ausschlaggebend sein.

Penicillium

Für die Marker *ITS1* und *ITS2* sind jeweils zwei Cluster zu erkennen. Bei dem *ITS1* - Baum zeigt sich, dass ein Cluster als OUTs definiert wurde. Es handelt sich um die Art *Penicillium chrysogenum*. *ITS2* besitzt ein Cluster bestehend aus *Penicillium funiculosum*. Ein weiteres Cluster besteht in beiden Markern aus *Penicillium funiculosum*, gruppiert mit *Penicillium chrysogenum*. Die Bt - Werte für die Marker liegen bei 99%. Durch *TUB2* und *TUB2 - Exon* war keine Unterscheidung der beiden Arten möglich, da diese sich untereinander gruppieren und keine eigenständigen Cluster ausbildeten. Die Bt - Werte liegen für *TUB2* zwischen 40% und 99% bzw. für *TUB2 - Exon* zwischen 50% und 86%.

Trichoderma

Eine Trennung der beiden Arten *Trichoderma harzianum* und *Trichoderma viride* war durch den *ITS1* - sowie den *ITS2* - Marker nicht möglich. In beiden Markern wurden die Arten zusammen gruppiert. Die Bt - Werte liegen zwischen 68% und 100%. Durch die Betrachtung des *RPB2* - Markers zeigte sich, dass die Art *T. viride* als *Outgroup* definiert wurde. Der Bt - Wert liegt dafür bei 90%. In den Markern *TEF1*, *TEF1 - Exon*, *TUB2* und *TUB2 - Exon* bildeten sich jeweils zwei Cluster. Eine Unterscheidung beider Arten wurde durch die Cluster der Marker *TEF1* (siehe Abbildung 19 - 6.5) und *TUB2 - Exon* möglich. Die beiden anderen Marker ließen keine Differenzierung zu. Es wird daher vermutet, dass die Intron - Region von *TEF1* und die Exon - Region von *TUB2* einen hohen Einfluss auf die Unterscheidung besitzen. Die Bt - Werte liegen für die beiden *TEF1* - Marker zwischen 60% und 100%, für die *TUB2* - Marker bei 100%.

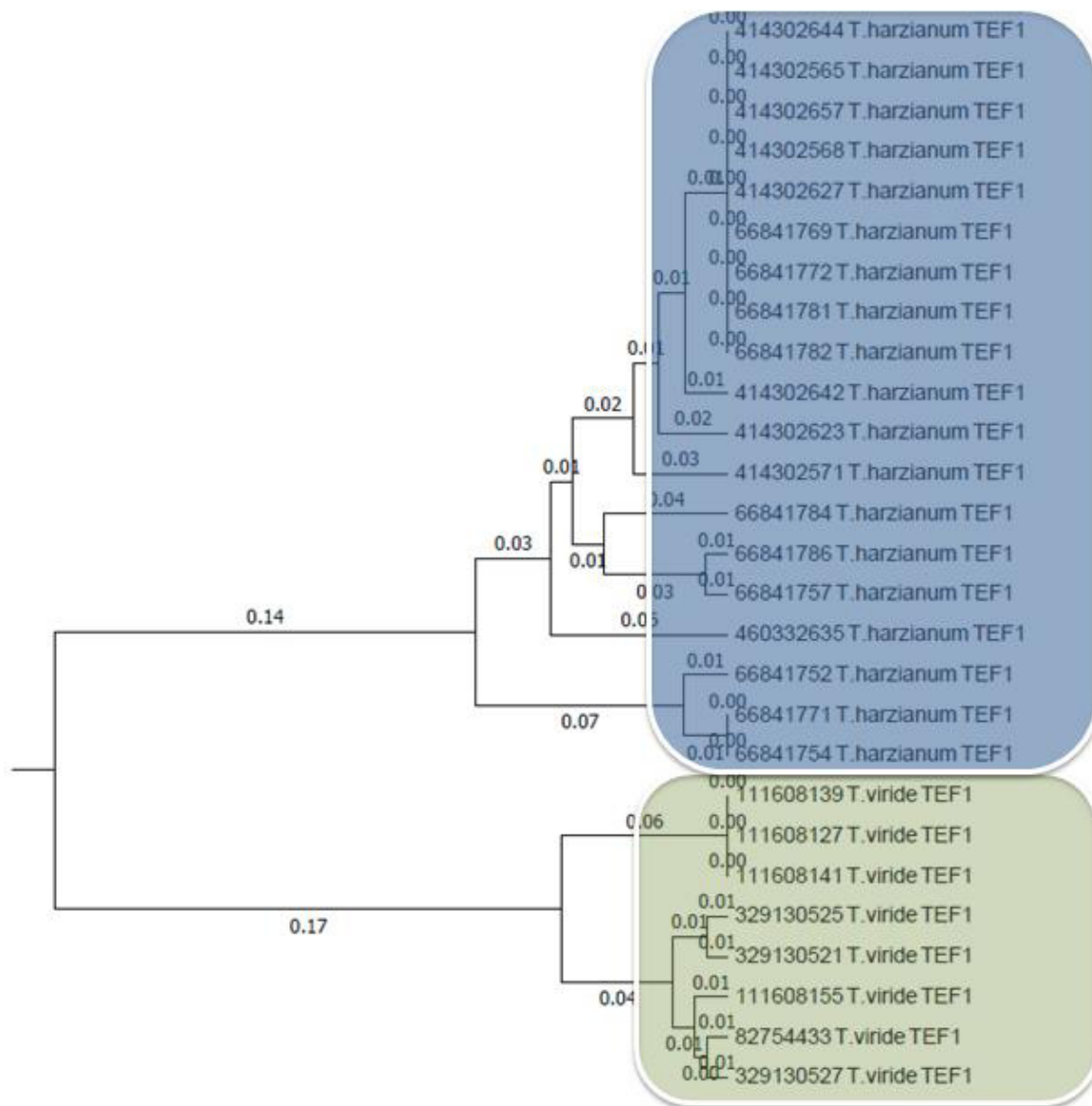


Abbildung 19 - 6.5 UPGMA, TEF1, Trichoderma

Die Abbildung zeigt eine Artenunterscheidung von *Trichoderma harzianum* (blau) und *Trichoderma viride* (grün). Für beide Arten entstand durch UPGMA jeweils ein Cluster. Die Werte an den Kanten repräsentieren die jeweiligen Distanzen zwischen den OTUs.

Neighbor - Joining, ClustalW_01

Alternaria

Für die Neighbor - Joining - Bäume gelten dieselben Cluster bezüglich aller Marker, welche bei UPGMA berechnet wurden. Die Bäume der beide Algorithmen unterscheiden sich dadurch, dass die Cluster bei NJ durch größere Distanzen zu benachbarten Clustern besser ausgebildet sind. Die Bt - Werte liegen mit ähnlichen Werten zueinander.

Aspergillus

Im Vergleich zu *UPGMA* konnten keine signifikanten Unterschiede für die Differenzierung der Marker und der Bt - Werte festgestellt werden.

Cladosporium

Bezüglich der *NJ* - Bäume gab es für den Marker *TEF1 - Exon* keine Unterscheidung der Arten *C. cladosporioides* und *C. herbarum*. Der Bt - Wert liegt zwischen 50% und 90%. Für die übrigen Marker gelten dieselben Ergebnisse, die unter Verwendung von *UPGMA* beschrieben wurden. Die Bt - Werte dieser Marker liegen für *NJ* - Bäume geringfügig unter den Bt - Werten von *UPGMA*.

Fusarium

Für die Artentrennung der Gattungen *Fusarium* zeigen sich dieselben Cluster für alle Marker der *NJ* - Bäume im Vergleich der *UPGMA* - Bäume. Des Weiteren ähneln sich die Bt - Werte für die Bäume der beiden Algorithmen.

Penicillium

Die Ergebnisse für *NJ* entsprechen denen von *UPGMA*. Für alle vier Marker war keine signifikante Unterscheidung der Arten möglich. Die Bt - Werte für *ITS1* und *ITS2* liegen zwischen 85% und 99%. Für die Marker *TUB2* und *TUB2 - Exon* liegen diese in einem Intervall von 81% bis 95% bzw. zwischen 33% und 74%.

Trichoderma

Sämtliche Marker zeigen dieselben Ergebnisse wie in den *UPGMA* - Bäumen. Dies gilt auch für die Bt - Werte, welche sich nur für die *ITS* - Marker unterscheiden. Für die *ITS* - Marker liegen die Bt - Werte zwischen 20% und 99%.

UPGMA, ClustalW_02

Alternaria

Für die Verwendung des MSAs *ClustalW_02* zeigen sich nur geringfügige Unterschiede bezüglich der Artenunterscheidung der Gattung *Alternaria*. Die Marker *ITS2* und *RPB2* besitzen keine Cluster. Die beiden Arten *A. alternata* und *A. tenuissima* sind untereinander gruppiert und lassen sich nicht unterscheiden. Der Marker *ITS1* zeigt dasselbe Ergebnis wie für die Bäume unter Verwendung von *ClustalW_01*. Es wurden zwei Cluster gebildet. Das erste Cluster besitzt nur OTUs von *A. alternata*, wohingegen das zweite Cluster aus Gruppierungen der Arten *A. alternata* und *A. tenuissima* besteht. Die Bt - Werte entsprechen derer aus *UPGMA* unter Verwendung von *ClustalW_01*. Die Marker *TUB2* und *TUB2 - Exon* bilden drei bzw. zwei Cluster aus, in denen die beiden Arten untereinander gruppiert sind. Daher ist eine Unterscheidung für diese Arten nicht möglich. Die Bt- Werte liegen für die Cluster in beiden Markern zwischen 40% und 99%.

Aspergillus

Bezüglich der Bäume von *UPGMA* unter Verwendung von *ClustalW_01* wurden keine Unterschiede für die Marker *ITS1*, *RPB2*, *TUB2*, und *TUB2 - Exon* festgestellt. Eine Ausnahme gilt für den Marker *ITS2*, dessen Baum auf Grund einer Fehlkonstruktion nicht auswertbar ist.

Cladosporium

Die Ergebnisse der phylogenetischen Bäume, welche unter Verwendung von *ClustalW_02* für *UPGMA* berechnet wurden, entsprechen den Bäumen von *UPGMA* unter Verwendung von *ClustalW_01*. Dies bedeutet, dass für die Marker *ACT*, *TUB2* und *TEF1* eine Unterscheidung der Arten *C. cladosporioides* und *C. herbarum* möglich war. Die Bt - Werte entsprechen den Bt - Werten von *UPGMA* unter Verwendung *ClustalW_01*.

Fusarium

Die Arten *Fusarium oxysporum* und *Fusarium solani* konnten durch die Marker *RPB2*, *TEF1*, *TEF1 - Exon* und *TOP2* eindeutig voneinander unterschieden werden. Für die Marker *ITS2* und *TUB2 - Exon* wurden fehlerhafte Bäume berechnet. Die übrigen Marker

ITS1 und *TUB2* entsprechen den Ergebnissen der *UPGMA* - Bäume unter Verwendung von *ClustalW_01*. Die Bt - Werte aller Marker sind geringer als die von *UPGMA* und *NJ* unter Verwendung von *ClustalW_01*.

Penicillium

Die Bäume für *ITS1* und *ITS2* zeigen, dass im Vergleich zu den *ClustalW_01* Ansatz jeweils ein zusätzliches Cluster gebildet wurde. Für beide Marker bestehen zwei Cluster aus *Penicillium chrysogenum*. Das dritte Cluster ist eine Gruppierung aus *Penicillium chrysogenum* und *Penicillium funiculosum*. Die Bt - Werte liegen für die Cluster zwischen 73% und 99%. Für den Marker *TUB2* ist keine Unterscheidung der Arten möglich. Die Bt - Werte liegen für *TUB2* in einem Bereich von 40% bis 96%. Der Marker *TUB2 - Exon* zeigt eine Differenzierung der Arten, indem *P. funiculosum* als *Outgroup* definiert wurde.

Trichoderma

Für die Marker *RPB2*, *TEF1*, *TEF1 - Exon*, *TUB2* und *TUB2 - Exon* sind die Ergebnisse für eine Unterscheidung der beiden Arten sowie die Bt - Werte der einzelnen Cluster identisch zu den Ergebnissen von *UPGMA* unter Verwendung von *ClustalW_01*. Die *ITS* - Marker unterscheiden sich zu dem Ansatz von *Clustal_01* in dem Maße, dass sich in den jeweiligen Bäumen zwei Cluster gebildet haben. Die Cluster können jedoch nicht genutzt werden, um die Arten *Trichoderma harzianum* und *Trichoderma viride* zu unterscheiden. Die beiden Arten gruppieren sich untereinander in den Clustern.

Neighbor - Joining, ClustalW_02

Alternaria

Im Vergleich zu *UPGMA* gibt es keine Unterschiede für die Separierung der Arten, da die entstanden bzw. nicht entstanden Cluster bezüglich aller Marker identisch sind. Unterschiede gibt es jedoch in den Bt - Werten, welche durchschnittlich geringer für *NJ* - Bäume sind.

Aspergillus

Die Ergebnisse für die Artenunterscheidung entsprechen der Ergebnissen von *UPGMA* unter Verwendung *ClustalW_02*.

Cladosporium

Für die Marker *ACT*, *ACT - Exon*, *TUB2*, *ITS1*, *ITS2* und *TEF1* gelten dieselben Ergebnisse wie unter *NJ* mittels *ClustalW_01* beschrieben. Auffällig ist, dass der Baum für den Marker *TEF1* eine Fehlkonstruktion war. Daher ist dieser nicht aussagekräftig. Die Bt - Werte entsprechen für alle Marker, ausgenommen *TEF1 - Exon*, denen von *NJ* unter Verwendung von *ClustalW_01*.

Fusarium

Die Ergebnisse für die Unterscheidung der Arten bezüglich der Marker entsprechen den Ergebnissen aus *UPGMA* unter Verwendung von *ClustalW_02*. Dies gilt ebenfalls für die Bt - Werte. Zusätzlich konnte für den Marker *TUB2* kein aussagekräftiges Ergebnis formuliert werden, da dieser Baum fehlerkonstruiert wurde.

Penicillium

Für die *Neighbor - Joining* - Bäume gelten dieselben Ergebnisse wie für die Bäume von *UPGMA* unter Verwendung von *ClustalW_02*. Dies gilt auch für die Bt - Werte.

Trichoderma

Für die *NJ* - Bäume gibt es keine unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich der *UPGMA* - Bäume von *ClustalW_02*. Dies gilt auch für die Clusterbildung und der daraus folgenden Differenzierung der Arten sowie für die Bt - Werte.

Zusammenfassung Ansatz 5

Alternaria

Für diese Gattung gibt es keine signifikanten Marker, wodurch eine Unterscheidung der Arten für die verwendeten Marker möglich ist. Dieses Ergebnis war nach Betrachtung des Ansatzes 1 zu erwarten, da die vorgestellten Konsensussequenzen eine 100%ige Identität aufzeigten. Diese Identität galt für alle untersuchten Marker.

Aspergillus

Eine Differenzierung der Arten war speziell für die Marker *RPB2*, *TUB2* und *TUB2 - Exon* möglich. Dabei wurden vor allem die Arten *A. niger*, *A. versicolor*, *A. vitis* und *A. penicilliioides* unterschieden. Besonders auffallend war die Art *A. vitis*, welche für die eben genannten Marker als auch für die Marker *ITS1* und *ITS2* zu den anderen Arten unterscheidbar war. Des Weiteren besitzt diese Art in allen Bäumen die größte Distanz zu den anderen Arten. Die Art *A. glaucus* konnte nicht differenziert werden.

Cladosporium

Für diese Gattung war eine Unterscheidung der Arten *C. cladosporioides* und *C. herbarum* durch die Marker *ACT*, *TUB2*, *TEF1* und *TEF1 - Exon* möglich. Der Marker *TEF1 - Exon* führte unter Verwendung von *Neighbor - Joining* zu keiner Differenzierung. Auffällig war des Weiteren, dass eine Unterscheidung der beiden Arten für *ACT - Exon* nicht möglich war. Daher lässt sich vermuten, dass die Intron - Region essenziell für eine Unterscheidung ist.

Fusarium

Fusarium oxysporum und *Fusarium solani* konnten durch die Marker *RPB2*, *TEF1*, *TEF1 - Exon* und *TOP2* eindeutig differenziert werden. Eine teilweise Unterscheidung war durch die Marker *ITS2* und *TUB2* möglich. In den Bäumen war jeweils ein Cluster, bestehend aus OTUs der bestimmten Art, zu erkennen. Auffällig ist, dass für *TUB2 - Exon* keine Unterscheidung möglich war. Es wird daher vermutet, dass die Intron - Regionen des *TUB2* - Markers signifikanten Einfluss auf eine Separierung der Arten besitzt. Des Weiteren zeigte sich, dass durch die Verwendung von *ClustalW_02* die Bäume für die Marker *ITS2*, *TUB2* und *TUB2 - Exon* fehlerhaft konstruiert wurden.

Penicillium

Für eine Artenunterscheidung sind die verwendeten Marker *ITS1*, *ITS2*, *TUB2* und *TUB2* - *Exon* nicht geeignet. Für den Marker *TUB2* - *Exon* konnte in dem Ansatz *ClustalW_02* eine mögliche Unterscheidung festgestellt werden, da die Art *P. funiculosum* als *Outgroup* definiert wurde.

Trichoderma

Bezüglich der Differenzierung von *Trichoderma harzianum* und *Trichoderma viride* lässt sich zusammenfassen, dass beide Arten durch die Marker *RPB2*, *TEF1* und *TUB2* - *Exon* unterschieden werden konnten. Auffällig ist, dass *TUB2* sowie *TEF1* - *Exon* keine Differenzierungen aufzeigen. Es wird daher vermutet, dass für die Unterscheidung der *Trichoderma* - Arten die Exon - Region von *TUB2* sowie die Intron - Region von *TEF1* Einfluss auf eine erfolgreiche Differenzierung haben.

Kapitel 6.6 Ansatz 6

In diesem Unterkapitel werden die phylogenetischen Bäume von *UPGMA* und *Neighbor - Joining* für die Artenunterscheidung beschrieben. Den Bäumen liegt ein MSA unter der Verwendung von *Muscle* zugrunde. *Muscle* unterscheidet sich im Weiteren durch zwei verschiedene Parametereinstellungen, *Muscle_01* und *Muscle_02*.

UPGMA, Muscle_01

Alternaria

Die Marker *RPB2* und *TUB2* können die Arten *Alternaria alternata* und *Alternaria tenuissima* nicht unterscheiden, da beide Schimmelpilze untereinander gruppiert sind und sich keine Cluster ausbildeten. Für den Marker *TUB2* - *Exon* entstand ein Cluster für *A. alternata*. Weitere Cluster enthielten Gruppierungen für beide Arten. Die B_t - Werte der Cluster bezüglich der drei Marker liegen zwischen 14% und 78%. Der Marker *ITS1* zeigt zwei Cluster auf. In dem ersten Cluster befinden sich OUTs von *A. alternata*. Das zweite Cluster enthält beide Arten. Für den Marker *ITS2* bildeten sich ebenfalls zwei Cluster. Diese enthielten beide *Alternaria* - Arten, welche sich miteinander gruppierten.

Die Bt - Werte für die *ITS* - Marker liegen bei 100%. Durch keinen der verwendeten Marker war eine signifikante Unterscheidung der Arten *A. alternata* und *A. tenuissima* möglich.

Aspergillus

Die Clusterbildung für den Marker *TUB2* ermöglicht eine Unterscheidung der Arten *Aspergillus niger*, *Aspergillus penicillioides*, *Aspergillus versicolor* und *Aspergillus vitis*. Ein weiteres Cluster zeigte eine Gruppierung der Arten *A. niger*, *A. versicolor* und *A. glaucus* auf. Daher ist eine Differenzierung für *A. glaucus* bezüglich *TUB2* nicht möglich. Die Cluster besitzen Bt - Werte zwischen 70% und 100%. Für *TUB2* - *Exon* entstanden drei Cluster, welche die Arten *A. niger*, *A. penicillioides* und *A. vitis* unterscheiden. Die Bt - Werte dieser Cluster betragen 100%. *A. vitis* bildete ein Cluster für den Marker *ITS1*. Die anderen Arten ließen sich nicht unterscheiden. Auch für den Marker *ITS2* ist keine Unterscheidung der Arten möglich, da diese keine Cluster ausbildeten und sich untereinander gruppieren. Der Marker *RPB2* grupperte die Arten *A. vitis* und *A. glaucus* miteinander. Die übrigen Arten *A. niger*, *A. versicolor* und *A. penicillioides* bildeten eigenständige Cluster. Die Bt - Werte betragen 100%.

Cladosporium

Für die Arten *Cladosporium cladosporioides* und *Cladosporium herbarum* bildeten sich für die Marker *ACT*, *TEF1* und *TEF1* - *Exon* jeweils zwei Cluster, wodurch eine Unterscheidung der beiden Arten möglich ist. Der Bt - Wert für die Cluster liegt über 75%. Für *ACT* - *Exon*, *ITS1* und *ITS2* bildeten sich ebenfalls zwei Cluster, jedoch war eine Unterscheidung der beiden Arten nicht möglich, da sich diese untereinander gruppieren. Der Bt - Wert für *ACT* - *Exon* bei 30%. Für die *ITS* - Marker liegen die Bt - Werte bei 100%. Es wird vermutet, dass die Intron - Region für *ACT* Einfluss auf eine mögliche Differenzierung hat. Die Art *C. herbarum* wurde in *TUB2* als *Outgroup* mit einem Bt - Wert von 100% definiert.

Fusarium

Die Marker *TUB2* - *Exon*, *TUB2_groß*, *TEF1* und *TEF1* - *Exon* bildeten zwei Cluster, durch welche eine Unterscheidung der Arten *Fusarium oxysporum* und *Fusarium solani* möglich ist. Die Bt - Werte für die Cluster von *TEF1* - *Exon* liegen bei 64% und 89%. Für

die anderen Marker liegen die Werte bei 100%. *TUB2_klein* ermöglichte keine Differenzierung der Arten, da die gebildeten Cluster beide Arten enthielten. Dieses Ergebnis zeigte sich auch für *ITS1*, *ITS2* und *RPB2*. Die Bt - Werte liegen für die drei Marker mit einem Intervall von 5% bis 62% auseinander. Die Art *F. solani* bildete in dem Marker *TOP2* die *Outgroup*. Der Bt - Wert für diese *Outgroup* liegt bei 100%.

Penicillium

Für die Marker *TUB2*, *TUB2 - Exon* und *ITS1* ist keine Unterscheidung der Arten *Penicillium chrysogenum* und *Penicillium funiculosum* möglich. Dies begründet sich damit, dass keine Cluster für diese Marker entstanden sind. Die Bt - Werte der einzelnen Gruppierungen liegen zwischen 12% und 90%. In dem Marker *ITS2* bildeten sich zwei Subcluster, welche zu einem *P. chrysogenum* und *P. funiculosum* zugeordnet werden. Diese Subcluster gruppierten sich jedoch mit übergeordneten Clustern, welche Gruppierungen der beiden Arten besitzen. Es kann daher nicht vermutet werden, dass dieser Marker die beiden *Penicillium* - Arten differenziert.

Trichoderma

Es bildeten sich für die Marker *TUB2*, *ITS1*, *ITS2* und *TEF1 - Exon* jeweils zwei Cluster. Die beiden Arten *Trichoderma harzianum* und *Trichoderma viride* sind in jedem Cluster miteinander gruppiert, was eine Unterscheidung der beiden Arten nicht ermöglicht. Die Bt - Werte der Cluster liegen bei 88% und 100%. Für den Marker *TUB2 - Exon* bildeten sich keine Cluster, wodurch auch für diesen Marker keine Unterscheidung der *Trichoderma* - Arten möglich ist. Die Bt - Werte der einzelnen Gruppierungen liegen zwischen 70% und 100%. Eine Differenzierung beider Arten war durch die Marker *TEF1* und *RPB2* möglich. *T. viride* bildete in dem Marker *RPB2* die *Outgroup* mit einem Bt - Wert von 100%. In *TEF1* bildeten sich zwei Cluster, welche sich jeweils in *T. viride* und *T. harzianum* unterscheiden. Es wird vermutet, dass die Intron - Regionen ausschlaggebend für eine Differenzierung der Arten bezüglich des *TEF1* - Markers sind.

Neighbor - Joining, Muscle_01

Alternaria

Die *NJ* - Bäume weisen für die Marker *ITS1*, *ITS2*, *RPB2* und *TUB2 - Exon* keine Unterschiede für die Differenzierung der *Alternaria* bezüglich der *UPGMA* - Bäume auf. Der Marker *TUB2* bildete unter *NJ* zwei Cluster aus, in welchen sich die beiden Arten untereinander gruppieren. Die Bt - Werte beider Cluster liegen bei 69% und 100%.

Aspergillus

Für die Bäume des *NJ* - Algorithmus lassen sich keine Unterschiede für die Differenzierung bezüglich der *UPGMA* - Bäume feststellen. Die Bt - Werte liegen für alle Marker ca. 10% geringer.

Cladosporium

Die Ergebnisse entsprechen denen von *UPGMA*, ausgenommen für den Marker *TEF1 - Exon*. Es zeigte sich, dass der Marker unter *NJ* fehlerkonstruiert wurde. Die Bt - Werte sind für alle Marker deutlich geringer im Vergleich zu den Bt - Werten der *UPGMA* - Bäume.

Fusarium

Für den Marker *TUB2 - Exon* bildeten sich zwei Cluster. Diese beinhalten die beiden *Fusarium* - Arten, wodurch eine Unterscheidung nicht möglich ist. Die Bt - Werte beider Cluster betragen 83% und 100%. Im Vergleich zu *UPGMA* wurde unter Verwendung von *NJ* keine *Outgroup* für *F. solani* bezüglich des *TOP2* - Markers gebildet. Daher ist für diesen Marker keine Unterscheidung der beiden Arten möglich. Die übrigen Marker sowie Bt - Werte entsprechen den Ergebnissen für *UPGMA*.

Penicillium

Für den Marker *ITS2* konnte keine Aussage auf Artenunterscheidung getroffen werden, da der Baum fehlerkonstruiert wurde. Die Ergebnisse für die Marker *ITS1*, *TUB2* und *TUB2 - Exon* entsprechen den Ergebnissen aus *UPGMA*.

Trichoderma

Im Vergleich zu *UPGMA* wurde durch den *ITS1* - Marker für den *NJ* - Baum eine Unterscheidung der Arten möglich. Für *ITS1* bildeten sich zwei Cluster, welche sich durch die Arten *T. viride* und *T. harzianum* unterscheiden. Der Bt - Wert für beide Cluster liegt bei 6% und 75%, was eine signifikante Unterscheidung der Arten als nicht realistisch vermuten lässt. Die anderen Marker zeigten dieselben Ergebnisse wie für *UPGMA*. Unterschiede gibt es bei den Bt - Werten. Die Cluster für *ITS1* betragen 18% sowie 73% und die Bt - Werte der Cluster von *TEF1 - Exon* liegen zwischen 0% und 45%.

UPGMA, Muscle_02Alternaria

Für die *Alternaria* - Arten zeigen sich ähnliche Ergebnisse zu den *UPGMA* - Bäume unter Verwendung von *Muscle_01*. Die Marker *TUB2*, *TUB2 - Exon* und *ITS1* bilden jeweils zwei Cluster aus. Die Cluster ermöglichen keine Unterscheidung zwischen den Arten *Alternaria alternata* und *Alternaria tenuissima*. Die Marker *ITS2* und *RPB2* besitzen keine Cluster. Die beiden Arten sind untereinander gruppiert, daher ist keine Differenzierung der Arten möglich. Die Bt - Werte entsprechen denen aus *UPGMA* unter Verwendung von *Muscle_01*.

Aspergillus

Wie unter Verwendung von *Muscle_01* konnten durch die Marker *TUB2*, *TUB2 - Exon* und *RPB2* unter der Bildung von Clustern eine Artenunterscheidung erreicht werden. Die Bt - Werte dieser Cluster liegen bei 100%. Für beide *ITS* - Marker war eine Differenzierung nicht möglich, da sich die Arten untereinander gruppierten und sich keine Cluster bildeten. Die Bt - Werte für *ITS2* liegen zwischen 0% und 85%

Cladosporium

Für die Arten *Cladosporium cladosporioides* und *Cladosporium herbarum* konnten dieselben Marker für eine Unterscheidung der beiden Arten bestimmt werden wie in *UPGMA* unter Verwendung von *Muscle_01*. Es handelt sich hierbei um die Marker *ACT*, *TUB2*, *TEF1* und *TEF - Exon*. Die Unterscheidung ist auf Grund der entstanden Cluster

möglich, welchen jeweils eine Art zugeordnet werden konnte. Speziell für den Marker *TUB2* wurde *C. herbarum* als *Outgroup* definiert. Für *ITS1* und *ITS2* ist keine Unterscheidung möglich. Die Bt - Werte ähneln den Werten von *UPGMA* unter Verwendung von *Muscle_01*.

Fusarium

Der Ansatz unter Verwendung von *Muscle_02* war nur von geringem Erfolg, da für die Marker *TUB2*, *TUB2 - Exon*, *ITS1* und *ITS2* fehlerhafte Bäume konstruiert wurden. Für diese Bäume zeigt sich ein hierarchischer Aufbau der OTUs. Eine Unterscheidung der Arten *Fusarium oxysporum* und *Fusarium solani* war durch die Marker *RPB2*, *TEF1*, *TEF1 - Exon* und *TOP2* möglich. Für diese Marker bildeten sich jeweils zwei Cluster. Jedem dieser Cluster wurde eine der beiden Arten zugeordnet. *TOP2* bildete für die Art *F. solani* eine *Outgroup*. Die Cluster sowie die *Outgroup* besitzen einen Bt - Wert zwischen 90% und 100%.

Penicillium

Für die Marker *TUB2 - Exon* und *ITS2* bildeten sich keine Cluster. Die beiden Arten gruppieren sich untereinander, wodurch keine Differenzierungen möglich sind. Die BT - Werte der Gruppierungen liegen für *TUB2 - Exon* zwischen 20% und 95% und für *ITS2* zwischen 37% und 98%. Es bildeten sich für den Marker *ITS1* Cluster aus. Diese Cluster teilten sich OTUs von *Penicillium chrysogenum* und *Penicillium funiculosum*. Daher ist eine Unterscheidung der Arten nicht möglich. In dem Marker *TUB2* wurde mit einem Bt - Wert von 100% die Art *P. funiculosum* als *Outgroup* definiert.

Trichoderma

Mehrere Cluster bildeten sich für die Marker *TUB2*, *ITS1*, *ITS2* und *TEF1 - Exon*. Diese Cluster ließen aber keine Unterscheidung für die Arten zu, da sich die beiden Arten in diesen Clustern gruppieren. Die BT - Werte der Cluster liegen für *TUB2* bei 100% und für *ITS1* sowie *ITS2* zwischen 0% und 60%. *TUB2 - Exon* bildete keine Cluster aus. Die Arten gruppieren sich untereinander. Für den Marker *TUB2* wurde *Trichoderma viride* als *Outgroup* definiert. Der Bt - Wert beträgt 100%. Eine Fehlkonstruktion erfolgte bei *TEF1*. Hier wurden die OTUs hierarchisch gruppiert.

Neighbor - Joining, Muscle_02

Alternaria

Für die *NJ* - Bäume gelten dieselben Erkenntnisse wie für *UPGMA*. Dies bedeutet, dass durch keine Marker eine Unterscheidung zwischen *A. alternata* und *A. tenuissima* möglich ist. Des Weiteren entsprechen die Bt - Werte auch denen von *UPGMA*.

Aspergillus

Es wurden keine Unterschiede für die Artendifferenzierung bezüglich der *UPGMA* - Bäume festgestellt. Weiterhin entsprechen die Bt - Werte der einzelnen Cluster bzw. Gruppierungen derer in *UPGMA*.

Cladosporium

Für die *NJ* - Bäume von *Muscle_02* zeigt sich, dass eine erfolgreiche Konstruktion des Baumes für den Marker *TEF1 - Exon* möglich war. Es ließ sich aber keine Differenzierung der *Cladosporium* - Arten erkennen. Die Bt - Werte der Cluster liegen bei 63% und 100%. Für den *ITS1* - und *ITS2* - Marker wurden fehlerhafte Bäume konstruiert, was sich durch einen hierarchischen Aufbau der OUTs verdeutlicht. Die übrigen Marker entsprechen den Ergebnissen von *UPGMA*. Die Bt - Werte sind den Bt - Werten von *NJ* unter Verwendung von *Muscle_01* ähnlich.

Fusarium

Die *ITS* - Marker sowie die Marker *TUB2*, *TUB2 - Exon*, *RPB2*, *TEF1* und *TEF1 - Exon* zeigen dieselben Ergebnisse wie für *UPGMA*. Die Gattung *F. solani* bildet bezüglich des Markers *TOP2* keine *Outgroup* sondern wird mit *F. oxysporum* gruppiert. Diese Gruppierung besitzt einen Bt - Wert von 100%. Daher ist für *TOP2* keine Unterscheidung der *Fusarium* - Arten möglich.

Penicillium

Bezüglich der *NJ* - Bäume gibt es zu den *UPGMA* - Bäumen für die Marker *TUB2* - *Exon*, *ITS1* und *ITS2* keine unterschiedlichen Ergebnisse. Auch verhalten sich die Bt - Werte ähnlich zu den Bt - Werten von *UPGMA*. Für den Marker *TUB2* wurde die Art *P. funiculosum* nicht als *Outgroup* definiert sondern mit der Art *P. chrysogenum* gruppiert. Der Bt - Wert für diese Gruppierung beträgt 50%.

Trichoderma

Die phylogenetischen Bäume des *NJ* - Algorithmus entsprechen den Bäumen von *UPGMA*. Dies gilt für die Fehlkonstruktion von *TEF1*, der *Outgroup* von *T. viride* des Marks *RPB2* sowie für die Cluster der Marker *TUB2*, *IST1* und *ITS2*. Die Bt - Werte von *NJ* sind den Bt - Werte von *UPGMA* ähnlich.

Zusammenfassung Ansatz 6

Alternaria

Für die beiden Arten *Alternaria alternata* und *Alternaria tenuissima* konnte durch die Verwendung des MSA - Algorithmus *Muscle* sowie der Clusteralgorithmen *Neighbor - Joining* und *UPGMA* keine Differenzierung der Arten festgestellt werden. Dieses Ergebnis entspricht den Ergebnissen aus Ansatz 1, Ansatz 2 und Ansatz 5.

Aspergillus

Die *Aspergillus* - Arten *Aspergillus niger*, *Aspergillus penicillioides*, *Aspergillus versicolor* und *Aspergillus vitis* ließen sich durch die Marker *TUB2*, *TUB2* - *Exon* und *RPB2* unterscheiden. Dabei zeigte sich, dass vor allem die Art *A. vitis* die größte Distanz zu den anderen Arten besitzt. Für die Art *Aspergillus glaucus* war keine Differenzierung möglich, da sich diese Art mit anderen Arten gruppierte. Eine Unterscheidung für die Marker *ITS1* und *ITS2* ist nicht gegeben.

Cladosporium

Eine Unterscheidung der Arten von *Cladosporium* ist unter Verwendung der Marker *ACT*, *TUB2*, *TEF1* und *TEF1 - Exon* möglich. Es fällt auf, dass für *ACT - Exon* keine Differenzierung möglich ist. Daher wird vermutet, dass für eine erfolgreiche Unterscheidung mittels *ACT* die Intron - Region berücksichtigt werden muss. Für die *ITS* - Marker konnten *Cladosporium cladosporioides* und *Cladosporium herbarum* nicht unterschieden werden. Zusätzlich zeigte sich, dass unter Verwendung des *Neighbor - Joining* - Algorithmus die Bäume der Marker *ITS1*, *ITS2* und *TEF1 - Exon* fehlerhaft konstruiert wurden.

Fusarium

Durch die Marker *TUB2 - Exon*, *RPB2*, *TEF1* und *TEF1 - Exon* konnte für *UPGMA* und *NJ* eine Unterscheidung der beiden *Fusarium* - Arten ermöglicht werden. Diese Unterscheidung ist durch die Ausbildung von artspezifischen Clustern möglich. Für den Marker *TOP2* zeigen sich unterschiedliche Interpretationen durch Clusteralgorithmen. Durch die zusätzliche Betrachtung der *Bt* - Werte kann nicht geklärt werden, ob eine Differenzierung der Arten wahrscheinlich ist. Die Ergebnisse für *Muscle_02* zeigen bezüglich *TUB2*, *TUB2 - Exon* sowie den *ITS* - Markern einen fehlerkonstruierten Baum. Dies wird durch hierarchische Anordnung der OTUs begründet.

Penicillium

Eine Artenunterscheidung für die Gattungen *Penicillium* ist durch die Marker *TUB2 - Exon*, *ITS1* und *ITS2* weder für *UPGMA* noch *NJ* möglich. Durch den Ansatz *Muscle_02* und dem Algorithmus *UPGMA* wurde mit einem *Bt* - Wert von 100% die Art *P. funiculosum* als *Outgroup* definiert. Dieses Ergebnis trifft für *NJ* unter Verwendung derselben MSA - Parameter nicht zu. In diesem Falle wurde die Art *P. funiculosum* mit *P. chrysogenum* gruppiert. Der *Bt* - Wert beträgt 50%. Tatsache ist, dass für eine Unterscheidung dieser Arten weitere Marker notwendig sind.

Trichoderma

Für eine Differenzierung der Arten *T. viride* und *T. harzianum* sind die Marker *TEF1* und *RPB2* geeignet. Da eine Differenzierung durch den Marker *TEF1 - Exon* nicht möglich ist, lässt vermuten, dass die Intron - Region einen signifikanten Einfluss auf die

Differenzierung haben könnte. Unter Verwendung der Marker *TUB2*, *TUB2 - Exon*, *ITS1* und *ITS2* war eine Unterscheidung ebenfalls nicht möglich, da beiden Arten sich untereinander gruppieren.

Kapitel 6.7 Zusammenfassung der phylogenetischen Bäume unter Berücksichtigung der sechs Ansätze

Dieses Unterkapitel wird zusammenfassen, für welche Gattungen und Arten eine Unterscheidung durch die Marker in den verschiedenen Ansätzen möglich war. Dafür wurden die Informationen der Cluster in den phylogenetischen Bäumen sowie die Bt - Werte für eine Wahrscheinlichkeit diese Cluster berücksichtigt.

Die folgende Tabelle fasst die Ergebnisse für die Gattungsunterscheidungen aus den Ansätzen 1 und 2 zusammen:

Tabelle 21 - 6.7 Zusammenfassung des Ansatz 1 und Ansatz 2

Die Tabelle zeigt, für welchen Ansatz unter Verwendung eines bestimmten Markers in den Konsensusbäumen eine Differenzierung der Gattungen möglich war. Ein X erklärt, dass keine Differenzierung möglich war.

| | <i>ITS1</i> | <i>ITS2</i> | <i>RPB2</i> | <i>TUB2</i> | <i>TUB2 - Exon</i> |
|-----------------|---------------------|--|--|--|--------------------|
| Ansatz 1 | X | <i>Trichoderma</i> , <i>Aureobasidium</i> | <i>Fusarium</i> , <i>Trichoderma</i> , <i>Cladosporium</i> | X | X |
| Ansatz 2 | <i>Cladosporium</i> | <i>Trichoderma</i> | <i>Fusarium</i> , <i>Trichoderma</i> , <i>Cladosporium</i> | <i>Fusarium</i> , <i>Cladosporium</i> | X |

Die im Anschluss folgenden zwei Tabellen fassen die Differenzierungen für Gattungen der Ansätze 3 und 4 zusammen:

Tabelle 22 - 6.7 Zusammenfassung des Ansatz 3 und Ansatz 4

Die Tabelle enthält die verschiedenen MSA - Ansätze und repräsentiert die Gattungen, welche durch die Marker ITS1, ITS2, TUB2_klein, TUB2_groß, TUB - Exon und RPB2 unterschieden werden konnten. Ein X steht dafür, dass keine Gattungen unter Verwendung des spezifischen Markers und des MSAs differenziert wurden.

| Ansatz | ITS1 | ITS2 | TUB2 _klein | TUB2 _groß | TUB2 - Exon | RPB2 |
|-------------------------|-------------|--|--|--|---|---|
| <i>ClustalW</i> _01 | X | <i>Trichoderma</i> <i>Mucor</i> <i>Penicillium</i> | <i>Epicoccum</i> | <i>Fusarium</i> | <i>Alternaria</i> <i>Mucor</i> <i>Penicillium</i> <i>Epicoccum</i> | <i>Alternaria</i> <i>Cladosporium</i> <i>Fusarium</i> <i>Trichoderma</i> |
| <i>ClustalW</i> _02, | X | X | <i>Epicoccum</i> | <i>Aspergillus</i> <i>Fusarium</i> <i>Penicillium</i> | X | <i>Alternaria</i> <i>Fusarium</i> <i>Trichoderma</i> |
| <i>Muscle</i> _01, | X | X | <i>Penicillium</i> <i>Epicoccum</i> | <i>Penicillium</i> <i>Aspergillus</i> <i>Trichoderma</i> | <i>Aspergillus</i> <i>Penicillium</i> | <i>Alternaria</i> <i>Cladosporium</i> <i>Fusarium</i> <i>Trichoderma</i> |
| <i>Muscle</i> _02, | X | X | X | X | <i>Alternaria</i> <i>Fusarium</i> <i>Penicillium</i> | <i>Trichoderma</i> <i>Fusarium</i> <i>Cladosporium</i> <i>Alternaria</i> |

Tabelle 23 - 6.7 Zusammenfassung des Ansatz 3 und Ansatz 4

Diese Tabelle steht im Kontext zur Tabelle 22 - 6.7. In diesem Fall werden unterschiedene Gattungen für die Marker ACT, ACT - Exon, TEF1, TEF1 - Exon und TOP in Abhängigkeit der MSAs zusammengefasst.

| Ansatz | ACT | ACT - Exon | TEF1 | TEF1 - Exon | TOP2 |
|-------------------------|---|---|--|--|---|
| <i>ClustalW</i> _01 | <i>Cladosporium</i> <i>Epicoccum</i> <i>Trichoderma</i> | <i>Cladosporium</i> <i>Epicoccum</i> <i>Trichoderma</i> | <i>Cladosporium</i> <i>Fusarium</i> <i>Trichoderma</i> | X | <i>Aspergillus</i> <i>Penicillium</i> <i>Fusarium</i> |
| <i>ClustalW</i> _02, | <i>Cladosporium</i> <i>Epicoccum</i> <i>Trichoderma</i> | <i>Cladosporium</i> <i>Epicoccum</i> | <i>Cladosporium</i> <i>Fusarium</i> <i>Trichoderma</i> | X | <i>Aspergillus</i> <i>Penicillium</i> <i>Fusarium</i> |
| <i>Muscle</i> _01, | <i>Cladosporium</i> <i>Epicoccum</i> <i>Trichoderma</i> | <i>Cladosporium</i> <i>Epicoccum</i> | <i>Cladosporium</i> <i>Fusarium</i> <i>Trichoderma</i> | <i>Cladosporium</i> <i>Fusarium</i> <i>Trichoderma</i> | <i>Aspergillus</i> <i>Penicillium</i> <i>Fusarium</i> |
| <i>Muscle</i> _02, | <i>Cladosporium</i> <i>Epicoccum</i> <i>Trichoderma</i> | <i>Cladosporium</i> <i>Epicoccum</i> <i>Trichoderma</i> | X | X | <i>Aspergillus</i> <i>Penicillium</i> <i>Fusarium</i> |

Die folgenden zwei Tabellen geben eine Zusammenfassung der Ansätze 5 und 6 für die Differenzierung der Arten wieder:

Tabelle 24 - 6.7 Zusammenfassung des Ansatz 5 und Ansatz 6

In dieser Tabelle werden die einzelnen Gattungen aufgezählt, für welche eine Differenzierung der Arten unter Verwendung der unterschiedlichen MSA - und Clusteralgorithmen möglich bzw. nicht möglich waren. Die hier betrachteten Marker sind *ITS1*, *ITS2*, *TUB2*, *TUB2 - Exon*, *RPB2* und *TOP2*. Die Bemerkung "ja" bedeutet eine Differenzierung der Arten für die spezifischen Marker und Algorithmen. Ein X steht für die fehlkonstruierten phylogenetischen Bäume bzw. dafür, dass keine Datengrundlage existiert.

| Gattung | Ansatz | ITS1 | ITS2 | TUB2 | TUB2 - Exon | RPB2 | TOP2 |
|---------------------|-------------------------------------|-------------|-------------|-------------|------------------------|-------------|-------------|
| <i>Alternaria</i> | <i>ClustalW_01,</i> <i>UPGMA</i> | nein | nein | nein | nein | nein | X |
| | <i>ClustalW_01, NJ</i> | nein | nein | nein | nein | nein | X |
| | <i>ClustalW_02,</i> <i>UPGMA</i> | nein | nein | nein | nein | nein | X |
| | <i>ClustalW_02, NJ</i> | nein | nein | nein | nein | nein | X |
| | <i>Muscle_01, UPGMA</i> | nein | nein | X | nein | X | X |
| | <i>Muscle_01, NJ</i> | nein | nein | nein | nein | X | X |
| | <i>Muscle_02, UPGMA</i> | nein | nein | nein | nein | nein | X |
| | <i>Muscle_02, NJ</i> | nein | nein | nein | nein | nein | X |
| <i>Aspergillus</i> | <i>ClustalW_01,</i> <i>UPGMA</i> | nein | ja | ja | ja | ja | X |
| | <i>ClustalW_01, NJ</i> | nein | ja | ja | ja | ja | X |
| | <i>ClustalW_02,</i> <i>UPGMA</i> | nein | X | ja | ja | ja | X |
| | <i>ClustalW_02, NJ</i> | nein | X | ja | ja | ja | X |
| | <i>Muscle_01, UPGMA</i> | nein | nein | ja | ja | ja | X |
| | <i>Muscle_01, NJ</i> | nein | nein | ja | ja | ja | X |
| | <i>Muscle_02, UPGMA</i> | nein | nein | ja | ja | ja | X |
| | <i>Muscle_02, NJ</i> | nein | X | ja | ja | ja | X |
| <i>Cladosporium</i> | <i>ClustalW_01,</i> <i>UPGMA</i> | nein | nein | ja | X | X | X |
| | <i>ClustalW_01, NJ</i> | nein | nein | ja | X | X | X |
| | <i>ClustalW_02,</i> <i>UPGMA</i> | nein | nein | ja | X | X | X |
| | <i>ClustalW_02, NJ</i> | nein | nein | ja | X | X | X |
| | <i>Muscle_01, UPGMA</i> | nein | nein | ja | X | X | X |
| | <i>Muscle_01, NJ</i> | nein | nein | ja | X | X | X |
| | <i>Muscle_02, UPGMA</i> | nein | nein | ja | X | X | X |
| | <i>Muscle_02, NJ</i> | nein | nein | ja | X | X | X |
| <i>Fusarium</i> | <i>ClustalW_01,</i> <i>UPGMA</i> | nein | nein | ja | nein | ja | ja |
| | <i>ClustalW_01, NJ</i> | nein | nein | ja | nein | ja | ja |
| | <i>ClustalW_02,</i> <i>UPGMA</i> | nein | X | ja | nein | ja | ja |

| | | | | | | | |
|--------------------|---------------------------|------|------|------|------|------|------|
| | <i>ClustalW_02, NJ</i> | nein | X | ja | X | ja | ja |
| | <i>Muscle_01, UPGMA</i> | nein | nein | ja | ja | nein | ja |
| | <i>Muscle_01, NJ</i> | nein | nein | nein | nein | nein | nein |
| | <i>Muscle_02, UPGMA</i> | X | X | X | X | ja | ja |
| | <i>Muscle_02, NJ</i> | X | X | X | X | ja | nein |
| <i>Penicillium</i> | <i>ClustalW_01, UPGMA</i> | nein | nein | nein | nein | X | X |
| | <i>ClustalW_01, NJ</i> | nein | nein | nein | nein | X | X |
| | <i>ClustalW_02, UPGMA</i> | nein | nein | nein | nein | X | X |
| | <i>ClustalW_02, NJ</i> | nein | nein | nein | nein | X | X |
| | <i>Muscle_01, UPGMA</i> | nein | nein | nein | nein | X | X |
| | <i>Muscle_01, NJ</i> | X | nein | nein | nein | X | X |
| | <i>Muscle_02, UPGMA</i> | nein | nein | ja | nein | X | X |
| | <i>Muscle_02, NJ</i> | nein | nein | ja | nein | X | X |
| <i>Trichoderma</i> | <i>ClustalW_01, UPGMA</i> | nein | nein | nein | ja | ja | X |
| | <i>ClustalW_01, NJ</i> | nein | nein | nein | ja | ja | X |
| | <i>ClustalW_02, UPGMA</i> | nein | nein | nein | ja | ja | X |
| | <i>ClustalW_02, NJ</i> | nein | nein | nein | ja | ja | X |
| | <i>Muscle_01, UPGMA</i> | nein | nein | nein | nein | ja | X |
| | <i>Muscle_01, NJ</i> | ja | nein | nein | ja | ja | X |
| | <i>Muscle_02, UPGMA</i> | nein | nein | nein | nein | ja | X |
| | <i>Muscle_02, NJ</i> | nein | nein | nein | nein | ja | X |

Tabelle 25 - 6.7 Zusammenfassung des Ansatz 5 und Ansatz 6

Diese Tabelle wird als Erweiterung der Tabelle 24 - 6.7 betrachtet. Die Legende steht analog zur Tabelle 24 - 6.7.

| Art | Ansatz | TEF1 | TEF1 - Exon | ACT | ACT - Exon |
|---------------------|---------------------------|------|-------------|-----|------------|
| <i>Cladosporium</i> | <i>ClustalW_01, UPGMA</i> | ja | ja | ja | nein |
| | <i>ClustalW_01, NJ</i> | ja | nein | ja | nein |
| | <i>ClustalW_02, UPGMA</i> | ja | ja | ja | nein |
| | <i>ClustalW_02, NJ</i> | ja | X | ja | nein |
| | <i>Muscle_01, UPGMA</i> | ja | ja | ja | nein |
| | <i>Muscle_01, NJ</i> | ja | X | ja | nein |
| | <i>Muscle_02, UPGMA</i> | ja | ja | ja | nein |
| | <i>Muscle_02, NJ</i> | ja | X | ja | nein |
| <i>Fusarium</i> | <i>ClustalW_01, UPGMA</i> | ja | ja | X | X |
| | <i>ClustalW_01, NJ</i> | ja | ja | X | X |
| | <i>ClustalW_02, UPGMA</i> | ja | ja | X | X |
| | <i>ClustalW_02, NJ</i> | ja | ja | X | X |
| | <i>Muscle_01, UPGMA</i> | ja | ja | X | X |
| | <i>Muscle_01, NJ</i> | ja | ja | X | X |
| | <i>Muscle_02, UPGMA</i> | ja | ja | X | X |
| | <i>Muscle_02, NJ</i> | ja | ja | X | X |
| <i>Trichoderma</i> | <i>ClustalW_01, UPGMA</i> | ja | nein | X | X |
| | <i>ClustalW_01, NJ</i> | ja | nein | X | X |
| | <i>ClustalW_02, UPGMA</i> | ja | nein | X | X |
| | <i>ClustalW_02, NJ</i> | ja | nein | X | X |
| | <i>Muscle_01, UPGMA</i> | ja | nein | X | X |
| | <i>Muscle_01, NJ</i> | ja | nein | X | X |
| | <i>Muscle_02, UPGMA</i> | X | nein | X | X |
| | <i>Muscle_02, NJ</i> | X | nein | X | X |

Die zusammenfassenden Tabellen bezüglich der Arten und Gattungsdifferenzierung ermöglichen eine Etablierung der Bestimmungsschlüssel. Dies werden in folgendem Kapitel beschrieben.

Kapitel 7 Ableitung der Bestimmungsschlüssel

Dieses Kapitel dient der Entwicklung für die Bestimmungsschlüssel aus den untersuchten Markern. Hierfür werden mögliche Bestimmungsschlüssel für Arten und Gattungen getrennt betrachtet. Zum Verständnis für die Herleitung eines Bestimmungsschlüssels wird auf die Tabellen 21 - 6.7 bis 25 - 6.7 verwiesen.

Kapitel 7.1 Gattungsspezifische

Bestimmungsschlüssel

Als potenzieller Bestimmungsschlüssel für die Differenzierung der Schimmelpilze entfallen beide *ITS* - Marker. Durch diese Marker konnten keine bzw. nur einmalige Gattungsunterscheidungen unter Verwendung der verschiedenen MSA - und Clusteralgorithmen getroffen werden. Die Separierung des *TUB2* - Markers beschreibt eine Differenzierung für *TUB2_klein* bezüglich der Gattung *Epicoccum*. Da für *TUB2_klein* nur einmalig eine Differenzierung von *Penicillium* erfolgte, wird der Marker nicht als Bestimmungsschlüssel für diese Gattung definiert. Für den Marker *TUB2_groß* wurden die Gattungen *Aspergillus*, *Fusarium* und *Penicillium* unterschieden. Da *Fusarium* in allen Ansätzen (ausgenommen *Muscle_02*) bezüglich der enthaltenen Gattungen unterschieden wurde, kann *TUB2_groß* als Bestimmungsschlüssel für *Fusarium* definiert werden. Die Gattungen *Aspergillus* und *Penicillium* wurden nur in 50% der Ansätze differenziert. Ein Bestimmungsschlüssel durch *TUB2_groß* darf für diese Gattungen angezweifelt werden. Der Marker *TUB2* - Exon kann als Bestimmungsschlüssel für die Gattung *Penicillium* angesehen werden. Für andere Gattungen ist deren Differenzierung zu selten, um diesen *TUB2* - Exon als Bestimmungsschlüssel zu zuordnen. Unter Verwendung des Markers *RPB2* konnten die meisten Gattungen voneinander differenziert werden. *RPB2* wird als Bestimmungsschlüssel für die Gattungen *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium* und *Trichoderma* definiert. Der Marker *TEF1* eignet sich als Bestimmungsschlüssel für die Gattungen *Cladosporium*, *Fusarium* und *Trichoderma*. Für *TEF1* - Exon konnte nur unter Verwendung von *Muscle_01* eine Differenzierung erfolgen. Daher wird *TEF1* - Exon als Bestimmungsschlüssel für die Unterscheidungen von Gattungen nicht verwendet. Als Bestimmungsschlüssel lassen sich die Marker *ACT* und *ACT* - Exon für die Gattungen *Cladosporium*, *Epicoccum* und *Trichoderma* bezeichnen. Der Marker *TOP2* differenziert die Gattungen *Aspergillus*, *Penicillium* sowie *Fusarium* und wird daher für diese Gattungen als Bestimmungsschlüssel verwendet. Für die Gattungen *Aureobasidium* und *Mucor* konnten keine Bestimmungsschlüssel für eine Unterscheidung zu anderen

Gattungen bestimmt werden. Grund hierfür sind die häufigen Gruppierungen zu anderen Gattungen in den phylogenetischen Bäumen.

Kapitel 7.2 Artspezifische Bestimmungsschlüssel

Alternaria

Für die Arten von *Alternaria* sind keine Bestimmungsschlüssel definierbar. Dies begründet sich dadurch, dass für die Marker *ITS1*, *ITS2*, *TUB2*, *TUB2 - Exon* und *RPB2* keine Differenzierungen für *Alternaria alternata* und *Alternaria tenuissima* möglich waren. Es ist erforderlich, weitere Marker zu berücksichtigen. Durch Sequenzierung der Marker *TEF1*, *ACT* und *TOP2* könnten mögliche Bestimmungsschlüssel entwickelt werden. Diese Vermutung wird auf Grund der erfolgreichen Unterscheidungen anderer Arten durch diese Marker gestützt.

Aspergillus

Als Bestimmungsschlüssel für *Aspergillus* - Arten können die Marker *TUB2*, *TUB2 - Exon* und *RPB2* verwendet werden. Für alle artspezifischen Ansätze war eine Trennung durch die Marker möglich. Speziell die Art *Aspergillus vitis* zeigte die größte Distanz bezüglich der anderen Arten.

Cladosporium

Für alle Ansätze war eine Unterscheidung der beiden *Cladosporium* - Arten durch die Marker *TUB2*, *TEF1* und *ACT* möglich. Diese Marker können als Bestimmungsschlüssel definiert werden. Speziell für den Marker *ACT* besitzen die Intron - Regionen eine große Relevanz für eine Artenunterscheidung. Eine Begründung liefert der *ACT - Exon* - Marker, durch welchen keine Unterscheidung der Arten realisiert und daher als Bestimmungsschlüssel nicht verwertbar ist.

Fusarium

Bestimmungsschlüssel für *Fusarium* - Arten sind *TEF1* und *TEF1 - Exon*. Für diese Marker wurden unter Verwendung aller artspezifischen Differenzierungsansätze eine Unterscheidung möglich. Der Marker *TUB2* kann nicht als Bestimmungsschlüssel

betrachtet werden, da eine Trennung der beiden *Fusarium* - Arten abhängig von dem zugrunde liegenden MSA ist.

Penicillium

Die phylogenetische Untersuchung der *Penicillium* - Arten ergab keine Bestimmungsschlüssel. Für keinen verwendeten Marker war eine Unterscheidung der Arten möglich. Dieses Ergebnis ist überraschend, da in Kapitel 3.3 beschrieben wurde, dass der Marker *TUB2* als Bestimmungsschlüssel für die Artenunterscheidung zu verwenden sei.

Trichoderma

Die Marker *TEF1* und *RPB2* können als Bestimmungsschlüssel für die *Trichoderma* - Arten definiert werden. Eine Differenzierung der Arten konnte durch *RPB2* für alle artspezifischen Ansätze erfolgen. Die Verwendung von *TEF1* war für *Muscle_02* nicht möglich. Grund hierfür könnten das *Gap* - *Cost* - *Model* sein. Des Weiteren wird vermutet, dass durch die *TEF1* - Intron - Region eine Differenzierung für die *Trichoderma* - Arten als weiter Bestimmungsschlüssel möglich ist.

Kapitel 8 Zusammenfassung und Ausblick

Ziel dieser Masterarbeit war es, Bestimmungsschlüssel für materialschädigende Schimmelpilze zu etablieren, um eine Datenbank für eine schnelle und kostengünstige Identifikation zu entwickeln. Zu diesem Zweck wurden durch unterschiedliche Forschungsgruppen (siehe Kapitel 1) sequenzielle Marker ausgewählt, welche als mögliche Bestimmungsschlüssel fungieren könnten. Unter Verwendung bioinformatischer Tool und Algorithmen wurden sechs verschiedene Ansätze entwickelt, um phylogenetische Analysen durchzuführen. Diese Analysen sollten feststellen, durch welche Marker die Gattungen und Arten der Schimmelpilze zu charakterisieren und differenzieren sind. Durch die Auswertung der resultierenden phylogenetischen Bäume zeigte sich, dass kein Marker als "der" Bestimmungsschlüssel für eine Differenzierung verwendet werden kann. Vielmehr muss eine Kombination an Bestimmungsschlüsseln für eine Arten - bzw. Gattungsunterscheidung in Betracht gezogen werden. Die möglichen Bestimmungsschlüssel werden in der folgenden Tabelle abschließend präsentiert.

Tabelle 26 - 8 Mögliche Bestimmungsschlüssel für die Differenzierung der Arten und Gattungen

Die Tabelle enthält die Marker, welche als Bestimmungsschlüssel für die Unterscheidung der Arten und Gattungen verwendbar sind. Sind keine Differenzierungen möglich für Art oder Gattung, wurde dies mit einen X beschrieben.

| Gattung | Bestimmungsschlüssel für Unterscheidung der Gattung | Bestimmungsschlüssel für Unterscheidung der Art |
|----------------------|--|--|
| <i>Alternaria</i> | <i>RPB2</i> | X |
| <i>Aspergillus</i> | <i>TUB2, TOP2</i> | <i>TUB2, TUB2 - Exon, RPB2</i> |
| <i>Aureobasidium</i> | X | keine Datengrundlage |
| <i>Cladosporium</i> | <i>RPB2, TEF1, ACT, ACT - Exon</i> | <i>TUB2, TEF1, ACT</i> |
| <i>Epicoccum</i> | <i>TUB2, ACT, ACT - Exon</i> | keine Datengrundlage |
| <i>Fusarium</i> | <i>TUB2, RPB2, TEF1, TOP2</i> | <i>TEF1, TEF1 - Exon</i> |
| <i>Mucor</i> | X | X |
| <i>Penicillium</i> | <i>TUB2, TUB2 - Exon, TOP2</i> | X |
| <i>Trichoderma</i> | <i>RPB2, TEF1, ACT, ACT - Exon</i> | <i>TEF1, RPB2</i> |

In dieser Masterarbeit wurde festgestellt, dass die verwendeten Marker nicht für alle Schimmelpilze mit einer Datengrundlage repräsentiert sind. Es sollte daher über eine zusätzliche Forschungsarbeit für die Sequenzierung fehlender DNA - Sequenzen nachgedacht werden. Da die Marker *ACT*, *TOP2* und *TEF1* zu den vielversprechendsten Ergebnissen zählen, sollte eine Sequenzierung primär für diese Marker erfolgen. Im Weiteren sollten die oben erwähnten Marker sowie zusätzlich die *TUB2* - und *RPB2* - Marker hinsichtlich ihrer qualitativen Aussage für die Gattungs - und Artendifferenzierung überprüft werden. Dafür wird empfohlen, weitere Schimmelpilze in die phylogenetische Analyse einzubeziehen. Beispielsweise sollte geprüft werden, ob die Untersuchung weiterer *Aspergillus* - Arten ebenfalls zu dem Resultat führt, dass für eine Artenunterscheidung die Marker *TUB2* und *TOP2* weiterhin als Bestimmungsschlüssel angesehen werden können. Die *ITS* - Marker sind vermutlich nicht als Bestimmungsschlüssel geeignet, da die DNA - Sequenzen sich zu sehr in ihrer Länge unterscheiden und teilweise nicht vollständig sequenziert wurden. Alternativ könnte erwogen werden, die ribosomalen Zwischenabschnitte an den *ITS* - Regionen zusätzlich zu untersuchen bzw. in der Analyse der *ITS* - Regionen zu berücksichtigen.

Die vorliegende Masterarbeit soll mit einem zeitlos gültigen Zitat abschließen:

"Wo damals die Grenzen der Wissenschaft waren, da ist jetzt die Mitte."

Georg Christoph Lichtenberg

Literaturverzeichnis

[Acker 1992]

J. Acker: *Primärstruktur der zweitgrößten Untereinheit der menschlichen RNA-Polymerase II (oder B)*. *Mol Biol* 226 (4); 1992; 1295-9;
doi : 10.1016 / 0022 - 2836 (92) 91071-V

[Baum 2007]

Jeremy O. Baum: *Understanding Bioinformatics*. Taylor & Francis Ltd.; Auflage: 1; 2007

[Begerow 2004]

Dominik Begerow: *Evolutionary relationships among β -tubulin gene sequences of basidiomycetous fungi*. *Mycol. Res* 108 (11): 1257 - 1263; 2004;
doi: 10.1017/S0953756204001066

[Benson 2008]

Dennis A. Benson: *GenBank*. *Nucleic Acids Research*; 2008; Vol. 37;
doi: 10.1093/nar/gkn723

[Bray 1973]

D. S. Bray: *Cold Spring Harhor Symp. Quant. Bid.* 37, 567- 571; 1973

[Brown]

Matthew W. Brown: *Phylogeny of the "Forgotten" Cellular Slime Mold, Fonticula alba, Reveals a Key Evolutionary Branch within Opisthokonta*. Department of Biological Sciences, University of Arkansas

[BVA 2011]

Berufsverband der Augenärzte Deutschlands e.V.: *Leitlinie Nr. 13 Keratitis*. 2011

[Dawkins 2007]

Richard Dawkins: *Das egoistische Gen - Jubiläumsausgabe*.
Spektrum Akademischer Verlag; 2007

[Dewey 2007]

Colin Dewey: *BMI/CS 776 Lecture #14:Multiple Alignment - MUSCLE*. 2007

[Drouin 1995]

Guy Drouin: *The Giardia lamblia Actin Gene and the Phylogeny of Eukaryotes*.
J Mol Evol; 1995; 41:841-849

[Duchesnes 2013]

Ernest Duchesne's: *Duchesne's Antagonism between molds and bacteria, an English Colloquial Translation*. 2. Michael Witty; 1 edition; July 16, 2013

[Einax 2003]

Esra Einax: *Oligonucleotide primers for the universal amplification of β -tubulin genes facilitate phylogenetic analyses in the regnum Fungi*. Urban & Fischer Verlag; Org. Divers. Evol. 3, 185–194; 2003

[Edgar_1 2004]

Robert C. Edgar: *MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput*. Nucleic Acids Research; 2004; Vol. 32; No. 5; doi: 10.1093/nar/gkh340

[Edgar_2 2004]

Robert C. Edgar: *Local homology recognition and distance measures in linear time using compressed amino acid alphabets*. Nucleic Acids Research; 2004; Vol. 32; No. 1; doi: 10.1093/nar/gkh180

[Felsenstein 1985]

Joseph Felsenstein: *Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap*. Evolution; Vol. 39; No. 4; 1985, pp. 783-791

[Faguy 1998]

David M. Faguy: *Cytoskeletal proteins: The evolution of cell*. Current Biology; 1998, 8:R338–R341

[Green 2006]

Agent Green - Biowaffen im Drogenkrieg. The Sunshine Project; April; 2006

[Gabrio]

Thomas Gabrio: *Vorkommen und gesundheitlich / allergologische Relevanz von Schimmelpilzen aus der Sicht der Umweltmedizin*. Landesgesundheitsamt Baden-Württemberg im Regierungspräsidium Stuttgart

[Gravelat 2008]

Fabrice N. Gravelat: *In Vivo Analysis of Aspergillus fumigatus Developmental Gene Expression Determined by Real-Time Reverse Transcription-PCR*. Infection and Immunity; Aug. 2008; p. 3632–3639; doi:10.1128/IAI.01483-07

[Guarro 1999]

Josep Guarro: *Developments in Fungal Taxonomy*. Clinical Microbiology Reviews; 1999; 12(3):454

[Hankeln 2010]

Thomas Hankeln: *Molekulare Phylogenie*. Institut für Molekularbiologie; 2010; Mainz

[Henry 2000]

Travis Henry: *Identification of Aspergillus Species Using Internal Transcribed Spacer Regions 1 and 2*. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38(4):1510

[Kampik 2005]

Anselm Kampik: *Über Therapie und Prognose der Endophthalmitis dargestellt anhand des Patientengutes der Augenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München*
München; 2005

[Keeling]

Patrick J. Keeling: *Foraminifera and Cercozoa Are Related in Actin Phylogeny: Two Orphans Find a Home?*. Canadian Institute for Advanced Research

[Kegel 2009]

Bernhard Kegel: *Epigenetik: Wie Erfahrungen vererbt werden*. DUMONT Literatur und Kunst Verlag; Auflage: 1; 2009

[Kershnar 1998]

Eric Kershnar: *Immunoaffinity Purification and Functional Characterization of Human Transcription Factor IIH and RNA Polymerase II from Clonal Cell Lines That Conditionally Express Epitope-tagged Subunits of the Multiprotein Complexes*. The Journal of Biological Chemistry; Vol. 273; No. 51; 1998; Issue of December 18, pp. 34444–34453

[Kim 2008]

Won Ki Kim: *Two Species of Penicillium Associated with Blue Mold of Yam in Korea*. *Mycobiology*; 2008 36(4) : 217-221

[Kimura]

Motto Kimura: *The neutral theory of molecular evolution and the world view of the neutralists*. National Institute of Genetics; Mishima

[Kinzel 2010]

Doris Kinzel: *Pitchfork Regulates Primary Cilia Disassembly and Left-Right Asymmetry*. *Dev Cell*. 2010 July 20; 19(1): 66–77; doi:10.1016/j.devcel.2010.06.005

[Kitamoto 1998]

N. Kitamoto: *Utilization of the TEF1-alpha gene (TEF1) promoter for expression of polygalacturonase genes, pgaA and pgaB, in Aspergillus oryzae*. Applied Microbiology and Biotechnology; 1998; 50(1):85-92; doi: 10.1007/s002530051260

[Kück, 2009]

Ulrich Kück: *Schimmelpilze Lebensweise, Nutzen, Schaden, Bekämpfung*. Springer; Dritte Auflage; 2009

[Leppchen 2014]

Kathrin Leppchen: *Forschungsantrag des DABES*. 2014

[Lecine 2000]

Patrick Lecine: *Hematopoietic-specific b1 tubulin participates in a pathway of platelet biogenesis dependent on the transcription factor NF-E2*. Blood journal; 2000; 96: 1366-1373

[Leser 2005]

Ulf Leser: *Bioinformatik Distanzbasierte phylogenetische Algorithmen*. Humboldt-Universität; 2005

[LGA 2004]

Landesgesundheitsamtes Baden-Württemberg: *Schimmelpilze in Innenräumen - Nachweis, Bewertung, Qualitätsmanagement*. 2004

[Lu 2013]

X.-L. Lu: *Taxonomy and epidemiology of Mucor irregularis, agent of chronic cutaneous mucormycosis*. Research Article; Persoonia 30, 2013: 48–56

[Matheny 2007]

P. Brandon Matheny: *Contributions of rpb2 and tef1 to the phylogeny of mushrooms and allies (Basidiomycota, Fungi)*. Molecular Phylogenetics and Evolution 43; 2007; 430–451

[Merget 2012]

B. Merget: *The ITS2 Database*. Department of Bioinformatics University of Würzburg; 2012

[Merkl 2009]

Rainer Merkl: *Bioinformatik Interaktiv: Algorithmen und Praxis*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; Auflage: 2. ergänzte Auflage; 2009

[Nübling]

Gudrun Just - Nübling: *Asperilluspneumonie bei Abwehrschwäche - die Qual der Wahl Azole, Echinocandine oder Ampho B*. Zentrum der Inneren Medizin - Infektiologie
Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

[Olijar]

Edgar Olijar: *Jenseits ClustalW: T-Coffee und Muscle*. 2013

[Ratnasingham 2007]

Sujeevan Ratnasingham: *BOLD: The Barcode of Life Data System*
www.barcodinglife.org). Molecular Ecology Notes; 2007;
doi: 10.1111/j.1471-8286.2006.01678.x

[Roger]

Andrew J. Roger: *An Evaluation of Elongation Factor 1a as a Phylogenetic Marker for Eukaryotes*. Oxford Journals

[Römpf, 2014]

RÖMPP-Redaktion: *Ochratoxine*. Römpf Online; Georg Thieme Verlag; 2014

[Saitou 1987]

Naruya Saitou: *The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees*. Mol. Biol. Evol.; 4(4):406-425; 1987

[Sang 1995]

Tao Sang: *Documentation of reticulate evolution in peonies (Paeonia) using internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA: Implications for biogeography and concerted evolution*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 92; pp. 6813-6817; July 1995

[Sayers 2009]

Eric W. Sayers: *Database resources of the National Center for Biotechnology Information*. Nucleic Acids Research; 2009; Vol. 37; doi:10.1093/nar/gks1189

[SAV 2009]

Spektrum Akademischer Verlag: *Humanbiologie kompakt*. Spektrum Akademischer Verlag; 2009; doi: 10.1007/978-3-8274-2239-2_15

[Schoch 2012]

Conrad L. Schoch: *Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi*. PNAS; April 17, 2012;
vol. 109; no. 16; 6241–6246

[Schultze 2011]

Gerhard Schultze-Werninghaus: *Allergische Atemwegs - und Lungenerkrankungen durch Schimmelpilze*. Umweltmed Forsch Prax 16 (2), 2011

[Sokal 1958]

Robert R. Sokal: *A statistical method for evaluating systematic relationships*. Science Bulletin; 1958; No. 22

[Swanson 2002]

Andrew R. Swanson: *Taxonomy, slime molds, and the questions we ask*. Mycologia; 94(6); 2002, pp. 968–979.

[Tamura 2004]

Koichiro Tamura: *Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method*. PNAS; 11030–11035; 2004; vol. 101 no. 30

[Tamura 2013]

Koichiro Tamura: *MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0*. Mol. Biol. Evol.; 30(12):2725–2729, 2013; doi:10.1093/molbev/mst197

[Thompson 1994]

Julie D. Thompson: *CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice*. Nucleic Acids Research; 1994; Vol. 22; No. 22 4673-4680

[UBA 2005]

Umweltbundesamt: *Leitfaden Zur Ursachensuche und Sanierung bei Schimmelpilzwachstum in Innenräumen*. 2005

[URL 1]

Thomas Paatsch: *Krank durch Schimmelpilze?*.

URL: <<http://www.schimmel-schimmelpilze.de/krank-durch-schimmelpilz.html>>

Verfügbar 20.08.2014

[URL 2]

Thomas Paatsch: *Alternaria alternata*.

URL: <<http://www.schimmel-schimmelpilze.de/alternaria-alternata.html>>

Verfügbar 20.08.2014

[URL 3]

Thomas Paatsch: *Alternaria tenuissima*.

URL: <<http://www.schimmel-schimmelpilze.de/alternaria-tenuissima.html>>

Verfügbar 20.08.2014

[URL 4]

Jochen Merx: *Alternaria tenuissima*.

URL: <<http://www.schimmel-sachverstaendiger.com/ratgeber/schimmelpilz/schimmelpilzgattungen-u-schimmelpilzarten/alternaria-tenuissima/>>

Verfügbar 20.08.2014

[URL 5]

Thomas Paatsch: *Eurotium herbariorum*.

URL: <<http://www.schimmel-schimmelpilze.de/eurotium-herbariorum.html>>

Verfügbar 20.08.2014

[URL 6]

Yuri: *Eurotium herbariorum (Aspergillus glaucus)*.

URL: <<http://thunderhouse4-yuri.blogspot.de/2013/11/eurotium-herbariorum-aspergillus-glaucus.html>> Verfügbar 20.08.2014

[URL 7]

Philipp Graf: *Schimmelpilze im Visier der Wissenschaft: Genom von Aspergillus niger entschlüsselt*.

URL: <<https://www.biotechnologie.de/BIO/Navigation/DE/root,did=47342.html?view=renderPrint>>

Verfügbar 20.08.2014

[URL 8]

Klaus Geith: *Gattung Aspergillus*.

URL: <<http://www.svb-geith.de/Seite77.html>>

Verfügbar 20.08.2014

[URL 9]

Thomas Paatsch: *Aspergillus versicolor*.

URL: <<http://www.schimmel-schimmelpilze.de/aspergillus-versicolor.html>>

Verfügbar 20.08.2014

[URL 10]

Malalanirina Sylvia Rakotonirainy: *Aspergillus amstelodami*.

URL: <<http://mycota-crc.mnhn.fr/site/specie.php?idE=78#ancre2>>

Verfügbar 20.08.2014

[URL 11]

Thomas Paatsch: *Aspergillus vitis*.

URL: <<http://www.schimmelschimmelpilze.de/aspergillus-vitis.html>>

Verfügbar 20.08.2014

[URL 12]

Thomas Paatsch: *Aureobasidium pullulans*.

URL: <<http://www.schimmel-schimmelpilze.de/aureobasidium-pullulans.html>>

Verfügbar 20.08.2014

[URL 13]

Malalanirina Sylvia Rakotonirainy: *Aureobasidium pullulans*.

URL: <<http://mycota-crcc.mnhn.fr/site/specie.php?idE=99#ancre6>>

Verfügbar 20.08.2014

[URL 14]

Thomas Paatsch: *Cladosporium cladosporioides*.

URL: <<http://www.schimmel-schimmelpilze.de/cladosporium-cladosporioides.html>>

Verfügbar 20.08.2014

[URL 15]

Jochen Merx: *Cladosporium herbarum*.

URL: <<http://www.schimmel-sachverstaendiger.com/ratgeber/schimmelpilz/schimmelpilzgattungen-u-schimmelpilzarten/cladosporium-herbarum/>>

Verfügbar 20.08.2014

[URL 16]

Thomas Paatsch: *Cladosporium herbarum*.

URL: <<http://www.schimmel-schimmelpilze.de/cladosporium-herbarum.html>>

Verfügbar 20.08.2014

[URL 17]

Malalanirina Sylvia Rakotonirainy: *Cladosporium herbarum*.

URL: <<http://mycota-crcc.mnhn.fr/site/specie.php?idE=102#ancre11>>

Verfügbar 20.08.2014

[URL 18]

Thomas Paatsch: *Epicoccum nigrum*.

URL: <<http://www.schimmel-schimmelpilze.de/epicoccum-nigrum.html>>

Verfügbar 20.08.2014

[URL 19]

Hartmut Heukelbach: *Schimmelpilze und Hefen*.

URL: <<http://med-heukelbach.de/allergologie12.htm>>

Verfügbar 20.08.2014

[URL 20]

Thomas Paatsch: *Fusarium oxysporum*.

URL: <<http://www.schimmel-schimmelpilze.de/fusarium-oxysporum.html>>

Verfügbar 20.08.2014

[URL 21]

Malalanirina Sylvia Rakotonirainy: *Fusarium solani*.

URL: <<http://mycota-crc.mnhn.fr/site/specie.php?idE=104>>

Verfügbar 20.08.2014

[URL 22]

Thomas Paatsch: *Fusarium solani*.

URL: <<http://www.schimmel-schimmelpilze.de/fusarium-solani.html>>

Verfügbar 20.08.2014

[URL 23]

Thomas Paatsch: *Penicillium chrysogenum*.

URL: <<http://www.schimmel-schimmelpilze.de/penicillium-chrysogenum.html>>

Verfügbar 20.08.2014

[URL 24]

Thomas Paatsch: *Penicillium funiculosum*.

URL: <<http://www.schimmel-schimmelpilze.de/penicillium-funiculosum.html>>

Verfügbar 20.08.2014

[URL 25]

Malalanirina Sylvia Rakotonirainy: *Penicillium funiculosum*.

URL: <<http://mycota-crc.mnhn.fr/site/specie.php?idE=108#ancre11>>

Verfügbar 20.08.2014

[URL 26]

Malalanirina Sylvia Rakotonirainy: *Penicillium chrysogenum*.

URL: <<http://mycota-crc.mnhn.fr/site/specie.php?idE=106#ancre7>>

Verfügbar 20.08.2014

[URL 27]

Encyclopaedia Britannica: *Penicillium glaucum*.

URL: <<http://www.britannica.com/EBchecked/topic/449889/Penicillium-glaucum>>

Verfügbar 20.08.2014

[URL 28]

Thomas Paatsch: *Trichoderma viride*.

URL: <<http://www.schimmel-schimmelpilze.de/trichoderma-viride.html>>

Verfügbar 20.08.2014

[URL 29]

Malalanirina Sylvia Rakotonirainy: *Trichoderma viride*.

URL: <<http://mycota-crcc.mnhn.fr/site/resultRech.php?lang=eng>>

Verfügbar 20.08.2014

[URL 30]

Thomas Paatsch: *Trichoderma harzianum*.

URL: <<http://www.schimmel-schimmelpilze.de/trichoderma-harzianum.html>>

Verfügbar 20.08.2014

[URL 31]

NCBI: *TEAD1 TEA domain family member 1 (SV40 transcriptional enhancer factor)*
[*Homo sapiens (human)*].

URL: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=7003>>

Verfügbar 20.08.2014

[URL 32]

UniProt: *K7UAR3*.

URL: <<http://www.uniprot.org/uniprot/K7UAR3>>

Verfügbar 20.08.2014

[URL 33]

InterPro: *DNA Topoisomerase*.

URL: <http://www.ebi.ac.uk/interpro/potm/2006_1/Page2.htm>

Verfügbar 20.08.2014

[URL 34]

Replikations-Elemente.

URL: <http://e-learning.studmed.unibe.ch/Gen_Kurs/GEN_KURS/REPLIKA/MECHZU09.HTM>

Verfügbar 20.08.2014

[URL 35]

Frank Antwerpes: *Aktin*.

URL: <<http://flexikon.doccheck.com/de/Aktin>>

Verfügbar 20.08.2014

[URL 36]

DNA Data Bank of Japan: *ClustalW HELP*.

URL: <<http://www.ddbj.nig.ac.jp/search/help/clustalwhelp-e.html>>

Verfügbar 20.08.2014

[URL 37]

MEGA 6: *CLUSTALW Options (DNA)*.

URL: <http://www.megasoftware.net/mega4/WebHelp/part_ii__assembling_data_for_analysis/building_sequence_alignments/clustalw/hc_clustalw_options_dna_dialog.htm>

Verfügbar 20.08.2014

[URL 38]

MEGA 6: *CLUSTALW Options (Protein)*.

URL: <http://www.megasoftware.net/mega4/WebHelp/part_ii__assembling_data_for_analysis/building_sequence_alignments/clustalw/hc_clustalw_options_protein_dialog.htm>

Verfügbar 20.08.2014

[URL 39]

Andrzej Elzanowski: *4. The Mold, Protozoan, and Coelenterate Mitochondrial Code and the Mycoplasma/Spiroplasma Code (transl_table=4)*.

URL: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/taxonomyhome.html/index.cgi?chapter=tgencodes#SG4>>

Verfügbar 20.08.2014

[URL 40]

MEGA 6: *Models for estimating distances*.

URL: <http://www.megasoftware.net/mega4/WebHelp/part_iv__evolutionary_analysis/computing_evolutionary_distances/distance_models/hc_models_for_estimating_distances.htm>

Verfügbar 20.08.2014

[URL 41]

MEGA 6: *Maximum Composite Likelihood Method.*

URL: <http://www.megasoftware.net/mega4/WebHelp/part_iv___evolutionary_analysis/computing_evolutionary_distances/distance_models/nucleotide_substitution_models/hc_mcl.htm>

Verfügbar 20.08.2014

[URL 42]

MEGA 6: *Analysis Preferences (NJ/UPGMA).*

URL: <http://www.megasoftware.net/mega4/WebHelp/part_iv___evolutionary_analysis/constructing_phylogenetic_trees/nj_upgma_methods/hc_nj_analysis_options.htm>

Verfügbar 20.08.2014

[URL 43]

HIV sequence database: *Consensus Maker v2.0.1.*

URL: <<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/CONSENSUS/consensus.html>>

Verfügbar 20.08.2014

[URL 44]

HIV sequence database: *Advanced Consensus Maker.*

URL: <<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/CONSENSUS/AdvCon.html>>

Verfügbar 20.08.2014

[URL 45]

HIV sequence database: *Advanced Consensus Explanation.*

URL:<<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/CONSENSUS/AdvConExplain.html>>

Verfügbar 20.08.2014

[URL 46]

Multiple alignment with the sum-of-pairs (SP) objective function.

URL: <<http://cs124.cs.ucdavis.edu/lectures/multextra.pdf>>

Verfügbar 20.08.2014

[URL 47]

MEGA 6: *Kimura 2-parameter distance.*

URL: <http://www.megasoftware.net/mega4/WebHelp/part_iv___evolutionary_analysis/computing_evolutionary_distances/distance_models/nucleotide_substitution_models/hc_kimura_2_parameter_distance.htm>

Verfügbar 20.08.2014

[URL 48]

Fred Opperdoes: *Construction of a distance tree using clustering with the Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA)*.

URL: <<http://www.icp.ucl.ac.be/~opperd/private/upgma.html>>

Verfügbar 20.08.2014

[URL 49]

Fred Opperdoes: *The Neighbor-Joining Method*.

URL: <<http://www.icp.ucl.ac.be/~opperd/private/neighbor.html>>

Verfügbar 20.08.2014

[URL 50]

MEGA 6: *Bootstrap Test of Phylogeny*.

URL: <http://www.megasoftware.net/mega4/WebHelp/part_iv___evolutionary_analysis/constructing_phylogenetic_trees/statistical_tests_of_a_tree_obtained/bootstrap_tests/hc_bootstrap_test_phylogeny.htm>

Verfügbar 20.08.2014

[URL 51]

Joseph Felsenstein: *Consense -- Consensus tree program*.

URL: <<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip/doc/consense.html>>

Verfügbar 20.08.2014

[URL 52]

EBI: *ClustalW2*.

URL: <<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>>

Verfügbar 20.08.2014

[URL 52]

PHYLIP.

URL: <<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>>

Verfügbar 20.08.2014

[Will 2008]

Kipling Will: *Phylogenetic trees VII- Tree selection, consensus, compromise*.

Spring; 2008; University of California; Berkeley

[Zechel 1978]

Kasper Zechel: *Actins from Mammals, Bird, Fish and Slime Mold Characterized by Isoelectric Focusing in Polyacrylamide Gels*. Max-Planck-Institut;

Biophysikalische Chemie; Göttingen; 1978

[Zelazowska 2007]

Monika Komon-Zelazowska: *Genetically Closely Related but Phenotypically Divergent Trichoderma Species Cause Green Mold Disease in Oyster Mushroom Farms Worldwide*. Appl. Environ. Microbiol. 2007, 73(22):7415; doi: 10.1128/AEM.01059-07.

[Zhang 2009]

Heng Zhang: *TEAD Transcription Factors Mediate the Function of TAZ in Cell Growth and Epithelial-Mesenchymal Transition*. The Journal of Biological Chemistry; 284, 13355-13362; 2009; doi: 10.1074/jbc.M900843200

[Zhao 2008]

Bin Zhao: *TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control*. The Journal of Biological Chemistry; 2008; doi: 10.1074/jbc.M800843200

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Masterarbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Mittweida, den 20.08.2014

Alexander Hampel